

С.Н. Мякишева<sup>1</sup>, Н.С. Линькова<sup>1, 2, 3</sup>, А.С. Дятлова<sup>1, 2</sup>, В.О. Полякова<sup>1, 2, 3</sup>, Г.А. Рыжак<sup>1</sup>

## ВЛИЯНИЕ ПЕПТИДОВ НА ХОНДРОГЕННУЮ ДИФФЕРЕНЦИРОВКУ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА ПРИ РЕПЛИКАТИВНОМ СТАРЕНИИ

<sup>1</sup> Санкт-Петербургский институт биорегуляции и геронтологии, 197110, Санкт-Петербург, пр. Динамо, 3, e-mail: ibg@gerontology.ru; <sup>2</sup> Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт фтизиопульмонологии, 191036, Санкт-Петербург, Лиговский пр., 2–4; <sup>3</sup> Белгородский национальный исследовательский университет, 308015, Белгород, ул. Победы, 85

Остеоартроз — широко распространенное ассоциированное с возрастом заболевание, для которого не существует эффективной таргетной терапии. В связи с этим активно разрабатываются методы биоинженерии, способные стимулировать восстановление хрящевой ткани. К ним относится хондрогенная дифференцировка стволовых клеток, для стимуляции которой применяют различные биомолекулы, в том числе короткие пептиды и полипептидные комплексы. В работе изучено влияние полипептидного комплекса хрящей (ППКХ) и пептида AED на экспрессию генов и синтез белков хондрогенной дифференцировки SOX9, агрекана, коллагена 2-го типа и COMP в культуре мезенхимальных стволовых клеток (МСК) человека при репликативном старении. Пептид AED в концентрации 200 нг/мл активирует экспрессию генов и синтез всех исследуемых белков при старении МСК. Для ППКХ этот эффект достигается в концентрации 2 000 нг/мл. Полученные данные свидетельствуют о стимулирующем влиянии изученных пептидов на регуляцию хондрогенеза и открывают перспективы дальнейшего исследования их эффективности в моделях остеоартроза.

**Ключевые слова:** хондрогенез, мезенхимальные стволовые клетки, пептиды, репликативное старение, остеоартроз

Остеоартроз — широко распространённое заболевание, характеризующееся повреждением суставного хряща, прилежащего к костной и мягкой тканям сустава. Оно характеризуется прогрессирующими необратимыми структурными изменениями хряща и выраженным болевым синдромом. Долгое время остеоартроз может протекать бессимптомно и впервые диагностируется в среднем и пожилом возрасте. Эффективной таргетной терапии этой патологии в настоящее время не найдено. Для его лечения применяют обезболивание при помощи нестероидных противовоспалительных средств и лечебную физкультуру. При острой боли и ос-

ложнениях используют внутрисуставное введение кортикостероидов [7].

Многообещающим направлением терапии остеоартроза являются методы регенерации хрящевой ткани. К ним относится получение мезенхимальных стволовых клеток (МСК) из различных тканей (плаценты, периферической крови, костного мозга, жировой ткани) с последующей дифференцировкой по хондрогенному пути в присутствии биологически активных веществ [14]. Изучение молекулярных каскадов хондрогенной дифференцировки стволовых клеток является актуальной задачей молекулярной геронтологии для разработки новых и модификации существующих методов репарации хрящевой ткани.

Среди ключевых факторов дифференцировки стволовых клеток в хондрогенном направлении идентифицированы белки SOX9, агрекан, коллаген 2-го типа и олигомерный матриксный белок хряща (COMP). SOX9 — один из транскрипционных факторов активации хондрогенеза [8, 16], вызывающий увеличение синтеза коллагена 2-го типа и агрекана [11] — основных белков внеклеточного матрикса гиалинового хряща [15, 17]. COMP, также известный как тромбоспондин-5, синтезируется хондробластами и опосредует взаимодействие между клетками и белками внеклеточного матрикса, в том числе агреканом и коллагеном 2-го типа [13]. Показано, что COMP стимулирует пролиферацию хондроцитов и хондрогенез [5].

Безопасным и физиологичным способом стимуляции дифференцировки МСК в хондроциты является применение пептидов. Один из распространенных подходов к имитации физиологической среды — функционализация поверхностей биоматериалов с помощью пептидов, полученных

из внеклеточного матрикса, способных рекрутировать стволовые клетки и активировать их дифференцировку. Пептиды различной длины применяют в качестве каркасных биоматериалов и для активации разнообразных сигнальных путей при тканевой инженерии хряща [12, 19–21].

В Санкт-Петербургском институте биорегуляции и геронтологии была разработана технология выделения полипептидных комплексов из различных органов и тканей молодых животных. Полипептидный комплекс, выделенный из хрящевой и костной тканей (ППКХ) телят не старше 12-месячного возраста, успешно применяли для терапии заболеваний опорно-двигательного аппарата. Содержание низкомолекулярной пептидной фракции в ППКХ составляет 70–90%. В состав низкомолекулярной пептидной фракции входят пептиды с молекулярной массой 75–846 Да [4]. ППКХ стимулирует развитие хрящевой ткани у эмбрионов цыплят и крыс [3]. ППКХ и входящий в его состав пептид АЕД (*H-Ala-Glu-Asp-OH*) обладают хондро- и геропротекторными свойствами [1]. Пептид АЕД способствует повышению минеральной плотности костной ткани скелета крыс [2]. Таким образом, ППКХ и пептид АЕД могут стимулировать дифференцировку соединительной ткани, что делает их перспективными кандидатами на изучение в качестве стимуляторов дифференцировки МСК по хондрогенному пути.

Цель работы — оценка влияния пептида АЕД и ППКХ на экспрессию генов и синтез белков хондрогенной дифференцировки МСК человека при репликативном старении.

### Материалы и методы

Исследование проведено на МСК человека линии SC5-MSC из ЦКП «Коллекция культур клеток позвоночных» Института цитологии РАН (Санкт-Петербург, Россия). Клетки выращивали в среде  $\alpha$ -МЕМ с добавлением 10% эмбриональной бычьей сыворотки. Пересев культуры осуществляли, используя раствор трипсина (0,25%) и версена (0,02%) (1:3), кратность рассева 1:4, плотность 4,0–5,0·10<sup>4</sup> клеток/см<sup>2</sup>. Клетки культивировали до 18-го пассажа и разделяли на пять групп: 1-я — контрольная; 2-я, 3-я — добавление пептида АЕД в концентрации 200 и 2000 нг/мл; 4-я, 5-я — добавление ППКХ в концентрации 200 и 2 000 нг/мл. В ранее проведенном исследовании пролиферативной активности культур хондроцитов было показано, что указанные концен-

трации пептида АЕД и ППКХ являются наиболее эффективными. На 18-м пассаже наблюдали статистически значимое снижение скорости удвоения клеток. Это указывает на репликативное старение МСК [9, 10]. Таким образом, клетки 18-го пассажа рассматривали как «старые», то есть подвергнутые репликативному старению.

Для оценки экспрессии генов, кодирующих белки SOX9, агрекан, коллаген 2-го типа, COMP, применяли ПЦР. Суммарную РНК выделяли из клеток с использованием раствора для стабилизации РНК IntactRNA («Евроген», Москва). Выделение РНК осуществляли, используя набор RNeasy MiniKit («Qiagen», FRG). Первую нить кДНК синтезировали с Revert Aid First Strand cDNA Synthesis Kit («Thermo Fisher Scientific Inc», США), используя 100 нг РНК на 20 мкл реакционной смеси. Полученную кДНК использовали как матрицу для количественной ПЦР из расчета 1 мкл на 24 мкл реакционной смеси. Количественную ПЦР проводили, используя набор для амплификации qPCRmix-HS SYBR+ROX («Евроген», Россия). Уровень экспрессии относительно референсного гена GAPDH определяли методом  $\Delta\Delta C_q$ . В экспериментах использовали по три независимых образца клеток каждой группы (биологические параллели). Для каждого образца кДНК проводили минимум три параллельные реакции в соседних лунках прибора (технические параллели). Далее экспериментальные значения сравнивали попарно с контрольными по двустороннему критерию Стьюдента. Достоверными считали различия при  $p < 0,01$ . Данные представляли в виде  $m \pm 2SD$ , где  $m$  — среднее значение,  $SD$  — стандартное отклонение.

Для сравнительного анализа синтеза белков, участвующих в хондрогенной дифференцировке, было проведено иммуноцитохимическое исследование клеток линии SC5-MSC. Для пермеабилитации мембран клеток в течение 10 мин применяли 0,1% Тритон X-100 («Биолот», Россия), растворенный в фосфатно-солевом буфере. Клетки инкубировали в 1% бычьем сывороточном альбумине, разведенном в фосфатно-солевом буфере ( $pH$  7,5), в течение 45 мин для блокировки неспецифического связывания антител. Инкубацию с первичными антителами проводили в течение 45 мин при комнатной температуре. В работе использовали первичные моноклональные антитела к SOX9 (1:150), агрекану (1:100), коллагену 2-го типа (1:100) и COMP (1:150) фирмы «Thermo Fisher Scientific»,

США. Ядра клеток докрашивали Hoechst 33258 («Thermo Fisher Scientific», США). Зеленая и красная флюоресценция характеризовала экспрессию исследуемых молекул [инкубация со вторичными антителами, конъюгированными с флюорохромом Alexa Fluor 488 или Alexa Fluor 647 (1:2 000, «Thermo Fisher Scientific», США), в течение 45 мин при комнатной температуре, в темноте]. Исследование проводили на конфокальном микроскопе «LSM 710» («Zeiss GmbH», Германия). Микрофотографии анализировали с помощью программы ImageJ («National Institutes of Health», США). В каждом случае просматривали пять полей зрения при ув. 200. Площадь экспрессии рассчитывали как отношение площади иммуноокрашенных клеток или их ядер к общей площади клеток или их ядер в поле зрения и выражали в процентах. Количественный метод анализа результатов иммунофлюоресцентного окрашивания клеток широко распространен в молекулярно-биологических исследованиях и позволяет проводить более точное сравнение данных в обследуемых группах по сравнению с визуальной оценкой [6, 18, 22].

Статистическая обработка данных включала подсчет среднего арифметического, стандартного отклонения и доверительного интервала и проводилась в программе Statistica 7.0. Для анализа вида распределения применяли критерий Шапиро—Уилка. Для проверки статистической однородности нескольких выборок использовали критерий Крускала—Уоллиса. Для попарного сравнения групп применяли *t*-критерий Стьюдента. Критический уровень достоверности нулевой гипотезы (об отсутствии различий) принимали равным 0,01.

## Результаты и обсуждение

### *Влияние пептида AED и полипептидного комплекса хряща на экспрессию гена Sox9 и синтез белка SOX9 в мезенхимальных стволовых клетках человека при репликативном старении*

Установлено, что при добавлении в культуру SC5-MSC пептида AED в концентрации 200 нг/мл на 18-м пассаже (модель репликативного старения) происходит повышение уровня мРНК *Sox9* в 2,4 раза по сравнению с контрольными культурами. Пептид AED в концентрации 2000 нг/мл повышает уровень мРНК *Sox9* в МСК при их репликативном старении в 2,6 раза по сравнению с контролем. ППКХ в концентрации 200 нг/мл не оказывает значимого влияния на уровень мРНК *Sox9* в клетках SC5-MSC, а в концентрации 2 000 нг/мл вызывает статистически значимое увеличение уровня этого показателя в 3,4 раза по сравнению с контролем (рис. 1, а). Схожую тенденцию наблюдали и для синтеза белка SOX9 клетками SC5-MSC, оцениваемую по параметру площади экспрессии. Пептид AED в концентрации 200 и 2 000 нг/мл повышает площадь экспрессии SOX9 в МСК при репликативном старении в 2,5 и 2,2 раза соответственно. ППКХ в концентрации 200 нг/мл не оказывает влияния на площадь экспрессии SOX9, а в концентрации 2 000 нг/мл увеличивает площадь экспрессии SOX9 в 2,9 раза при старении МСК (см. рис. 1, б). Таким образом, пептид AED индуцирует экспрессию гена и синтез белка SOX9 в МСК человека при старении *in vitro* в обеих исследуемых концентрациях. ППКХ индуцирует экспрессию гена и синтез белка SOX9 в стареющих МСК более выражено по сравне-

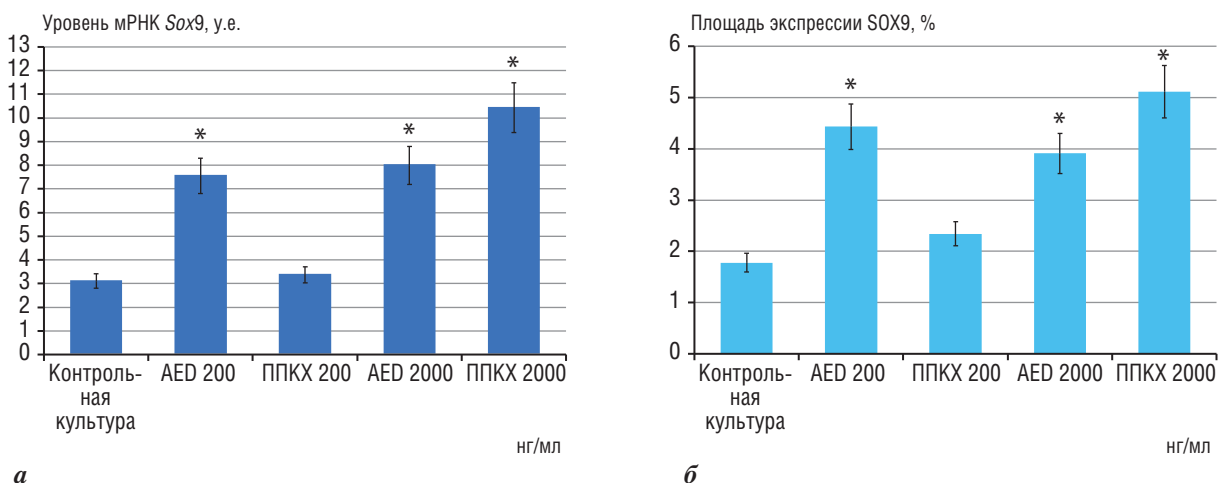


Рис. 1. Уровень мРНК *Sox9* (а) и площадь экспрессии SOX9 (б) в мезенхимальных стволовых клетках человека при репликативном старении при воздействии пептидов в разных концентрациях.

\*  $p < 0,01$  — по сравнению с контрольной культурой

нию с пептидом AED, но только в концентрации 2 000 нг/мл.

**Влияние пептида AED и полипептидного комплекса хряща на экспрессию гена и синтез белка агрекана в мезенхимальных стволовых клетках человека при репликативном старении**

При добавлении в культуру клеток SC5-MSC при репликативном старении пептида AED в концентрации 200 нг/мл происходит статистически значимое повышение уровня мРНК агрекана в 1,4 раза по сравнению с контрольной культурой. При этом добавление пептида AED в концентрации 2 000 нг/мл и ППКХ в концентрации 200 нг/мл не влияет на этот показатель в МСК человека при их старении. ППКХ в концентрации 2000 нг/мл вызывает повышение уровня мРНК агрекана в стареющих МСК в 2,1 раза по сравнению с контрольной культурой (рис. 2, а). Такая же зависимость проявляется и при определении синтеза белка агрекана клетками SC5-MSC.

Добавление пептида AED в концентрации 200 нг/мл и ППКХ в концентрации 2 000 нг/мл вызывает увеличение площади экспрессии агрекана, соответственно, в 1,6 и 2,4 раза по сравнению с контрольной культурой в МСК в модели репликативного старения. В то же время, пептид AED в концентрации 2 000 нг/мл и ППКХ в концентрации 200 нг/мл не оказывают влияния на синтез агрекана (см. рис. 2, б). Таким образом, действие пептида AED и ППКХ на экспрессию гена и синтез белка агрекана отличаются от рассмотренного выше действия этих комплексов на белок SOX9

при репликативном старении МСК человека. Наблюдается зависимость эффекта от концентрации, причем для AED наиболее эффективной оказалась меньшая концентрация (200 нг/мл), а для ППКХ — большая (2 000 нг/мл).

**Влияние пептида AED и полипептидного комплекса хряща на экспрессию гена и синтез коллагена 2-го типа в мезенхимальных стволовых клетках человека при репликативном старении**

Добавление в культуру клеток SC5-MSC при репликативном старении пептида AED и ППКХ в дозах 200 и 2 000 нг/мл вызывало повышение экспрессии гена и синтеза коллагена 2-го типа (рис. 3). Наиболее выраженный эффект оказывал ППКХ в концентрации 2 000 нг/мл, повышая уровень мРНК *Coll2* в 3,1 раза и площадь экспрессии коллагена 2-го типа в 3,8 раза по сравнению с контрольными культурами. ППКХ в концентрации 200 нг/мл оказывал менее выраженное влияние на эти показатели: уровень мРНК *Coll2* повышался в 2 раза, а площадь экспрессии — в 2,2 раза по сравнению с контрольной культурой. Пептид AED оказывал на экспрессию и синтез коллагена 2-го типа в стареющих МСК человека одинаковое влияние в концентрации 200 и 2 000 нг/мл, повышая исследуемые показатели в среднем в 2,5 раза.

На рис. 4 представлены результаты иммунофлюоресцентного окрашивания коллагена 2-го типа в клетках SC5-MSC в контрольной культуре (а), при добавлении пептида AED в концентрации 200 нг/мл (б) и при добавлении ППКХ в концентрации 2 000 нг/мл. Иммуноокрашивание коллагена 2-го типа (красная флуоресценция) интенсивнее

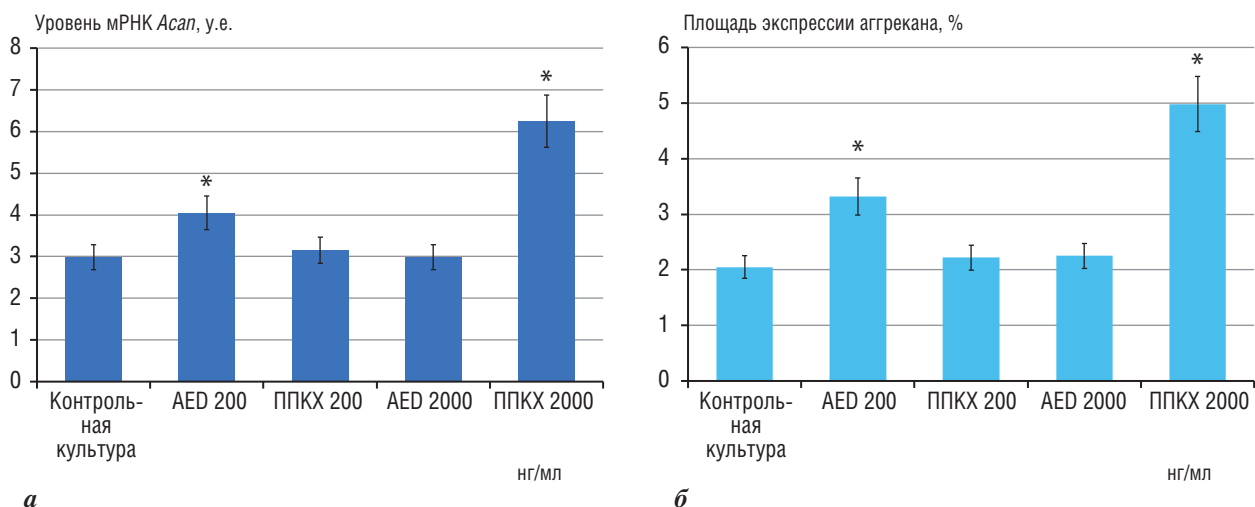


Рис. 2. Уровень мРНК (а) и площадь экспрессии (б) агрекана в мезенхимальных стволовых клетках человека при репликативном старении при воздействии пептидов в разных концентрациях.

\*  $p < 0.01$  — по сравнению с контрольной культурой (без добавления пептида и полипептидного комплекса хрящей)

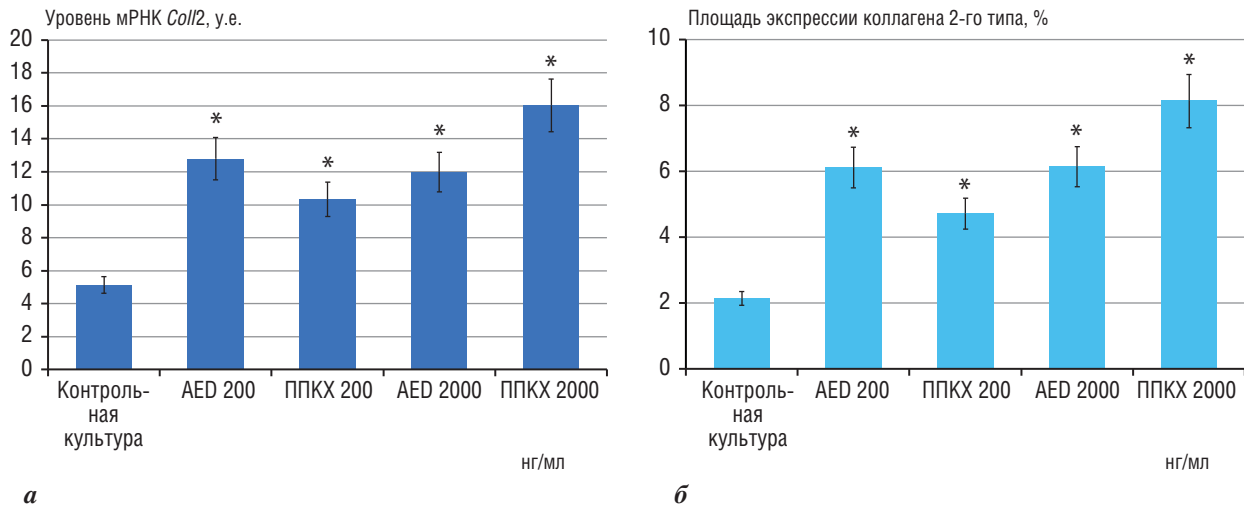


Рис. 3. Уровень мРНК (а) и площадь экспрессии (б) коллагена 2-го типа в мезенхимальных стволовых клетках человека при репликативном старении при воздействии пептидов в разных концентрациях.

\*  $p < 0,01$  — по сравнению с контрольной культурой (без добавления пептида и полипептидного комплекса хрящей)

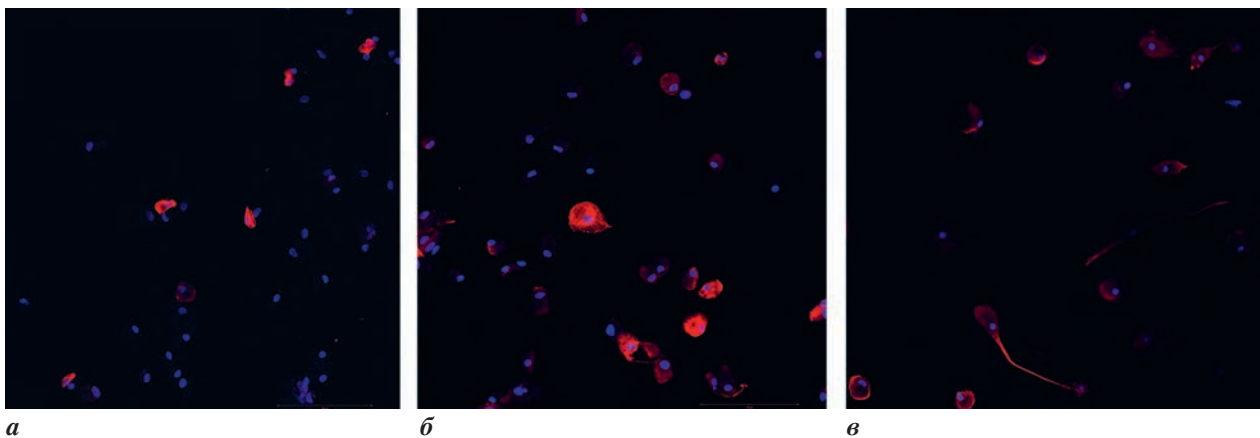


Рис. 4. Результаты иммунофлуоресцентного окрашивания клеток SC5-MSC антителами к коллагену 2-го типа в контрольной культуре (а) и при добавлении пептида AED в концентрации 200 нг/мл (б) и полипептидного комплекса хрящей в концентрации 2 000 нг/мл (в)

в культурах клеток с добавлением AED и ППКХ по сравнению с контрольными культурами.

**Влияние пептида AED и полипептидного комплекса хряща на экспрессию гена и синтез олигомерного матричного белка хряща (COMP) в мезенхимальных стволовых клетках человека при репликативном старении**

Определение уровня мРНК и площади экспрессии белка COMP в клетках SC5-MSC при репликативном старении и воздействии пептида AED и ППКХ показало, что паттерны экспрессии и синтеза здесь распределены практически так же, как и в случае агрекана. Однако наиболее выраженное действие на уровень мРНК COMP при старении МСК оказывает пептид AED в концентрации 200 нг/мл, повышая этот показатель в 3,5 раза по сравнению с контрольной

культурой. ППКХ в дозе 2 000 нг/мл вызывает повышение уровня мРНК COMP в стареющих МСК в 2,7 раза по сравнению с контрольной культурой. При этом пептид AED в концентрации 2 000 нг/мл и ППКХ в концентрации 200 нг/мл не оказывают влияния на экспрессию гена COMP в клетках SC5-MSC при репликативном старении (рис. 5, а). Пептид AED в концентрации 200 нг/мл и ППКХ в концентрации 2000 нг/мл вызывали повышение площади экспрессии COMP в 2,3 раза при старении МСК по сравнению с контрольной культурой (см. рис. 5, б).

Установлено, что пептид AED и ППКХ в различных концентрациях стимулируют экспрессию генов и синтез белков-регуляторов хондрогенной дифференцировки МСК человека при репликативном старении — SOX9, агрекана, коллагена

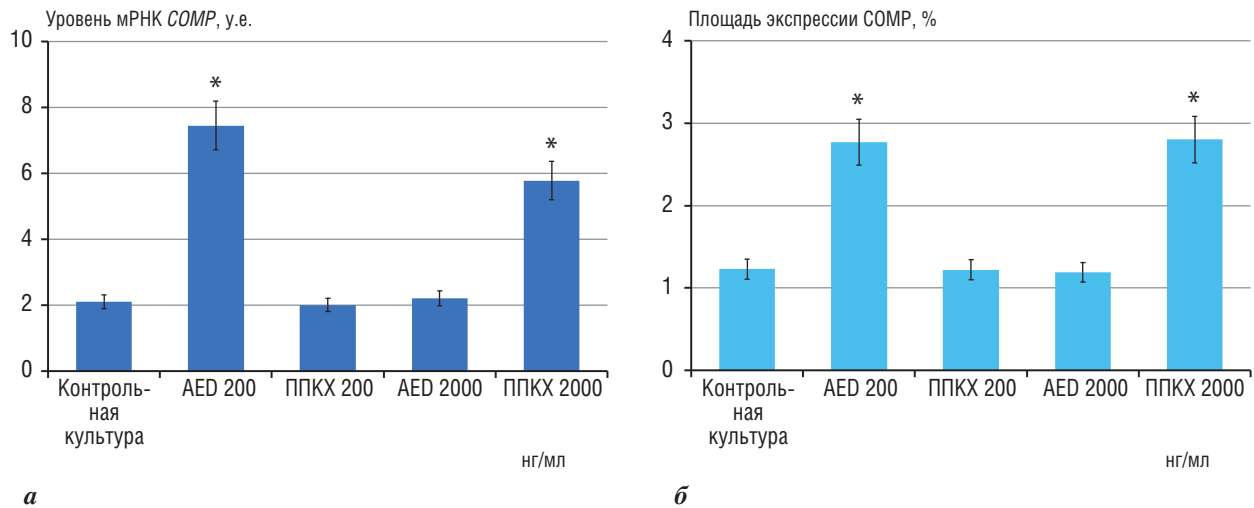


Рис. 5. Уровень мРНК (а) и площадь экспрессии (б) COMP в мезенхимальных стволовых клетках человека при репликативном старении при воздействии пептидов в разных концентрациях.

\*  $p < 0,01$  — по сравнению с контрольной культурой (без добавления пептида и полипептидного комплекса хрящей)

2-го типа и COMP. Пептид AED в концентрации 200 нг/мл активирует экспрессию генов и синтез этих белков при старении хондроцитов *in vitro*, наиболее сильно влияя на коллаген 2-го типа и COMP. ППКХ в концентрации 2 000 нг/мл также оказывает выраженное стимулирующее влияние на экспрессию генов и синтез всех исследуемых белков в МСК человека при старении *in vitro*.

Известно, что ППКХ стимулирует пролиферацию и дифференцировку клеток соединительной ткани при старении, однако до сих пор не было проведено исследований по оценке молекулярных механизмов его геро- и хондропротекторного действия. Результаты нашего исследования демонстрируют, что ППКХ имеет выраженный дозозависимый эффект: повышение его концентрации с 200 до 2 000 нг/мл приводит к значительному увеличению экспрессии генов и экспрессии белков — факторов хондрогенеза. Интересно отметить, что даже в небольшой концентрации (200 нг/мл) ППКХ статистически достоверно стимулирует экспрессию гена *Coll2* и синтез коллагена 2-го типа. Поскольку снижение синтеза последнего является одним из основных признаков ухудшения функциональной активности хондроцитов при старении, эти данные указывают на геропротекторное действие ППКХ. Влияние ППКХ на все исследуемые молекулы, за исключением COMP, более выражено, чем действие пептида AED, что может быть объяснено наличием других пептидных молекул в составе полипептидного комплекса, которые также вносят вклад в стимуляцию дифференцировки МСК. Учитывая, что ППКХ в концентрации 2 000 нг/мл повышает экспрессию генов и синтез всех исследуемых бел-

ков, можно предположить, что ППКХ оказывает влияние на хондрогенез как на уровне регуляции транскрипционных факторов (в частности, регулируя синтез *Sox9*), так и на уровне белков внеклеточного матрикса. Вероятно, повышенный синтез *Sox9* вызывает индукцию экспрессии генов и синтеза белков агрекана, коллагена 2-го типа и COMP. Это, в свою очередь, может способствовать восстановлению пролиферации хондроцитов и хондрогенезу, которые нарушаются при старении [13].

Влияние пептида AED на дифференцировку МСК имеет тенденцию, схожую с ППКХ. По-видимому, пептид AED индуцирует экспрессию гена и синтез белка *Sox9* в МСК человека при репликативном старении, что вызывает дальнейшую индукцию нижестоящих эффекторов хондрогенеза и белков внеклеточного матрикса. При этом синтез агрекана и COMP при репликативном старении МСК повышается только под действием трипептида в концентрации 200 нг/мл, а синтез коллагена 2-го типа одинаково чувствителен как в концентрации пептида 200 нг/мл, так и 2 000 нг/мл.

### Заключение

Полученные данные свидетельствуют о том, что полипептидный комплекс хрящей и пептид AED являются перспективными для дальнейшего изучения в качестве геропротекторных веществ, стимулирующих дифференцировку мезенхимальных стволовых клеток человека при старении *in vitro* по хондрогенному пути. Этот геропротекторный эффект пептидов может быть важен с точки зрения поддержания пула функционально активных хондроцитов, снижение количества которых с воз-

растом является одним из факторов, приводящих к развитию остеоартроза. Благодаря наличию множества коротких биологически активных пептидов, в том числе АЕД, полипептидный комплекс хрящевой может рассматриваться как стимулятор репарации хрящевой ткани при ее старении и ассоциированных с возрастом заболеваний, в том числе остеоартроза.

Конфликт интересов отсутствует.

## Литература

1. Журкович И.К., Ковров Н.Г., Рыжак Г.А. и др. Идентификация коротких пептидов в составе полипептидных комплексов, выделенных из органов животных // Успехи соврем. биол. 2020. № 2 (140). С. 140–148.
2. Поворозник В.В., Хавинсон В.Х., Макогончук А.В. и др. Изучение влияния пептидных регуляторов на структурно-функциональное состояние костной ткани крыс при старении // Успехи геронтол. 2007. № 2 (20). С. 134–137.
3. Чалисова Н.И., Рыжак Г.А., Ивко О.М. Проллиферотропное влияние пептидов на органотипическую культуру тканей млекопитающих и птиц // Молекул. мед. 2021. № 5 (19). С. 29–32.
4. Хавинсон В.Х., Малинин В.В., Рыжак Г.А. Средство, нормализующее функции хрящевой ткани, и способ его получения: Патент РФ RU 2302872. 2007. Бюл. 35/2008.
5. Andrés Sastre E., Maly K., Zhu M. et al. Spatiotemporal distribution of thrombospondin-4 and -5 in cartilage during endochondral bone formation and repair // Bone. 2021. Vol. 150. P. 115999.
6. Gutop E.O., Linkova N.S., Kozhevnikova E.O. et al. AEDG Peptide Prevents Oxidative Stress in the Model of Induced Aging of Skin Fibroblasts // Adv. Geront. 2022. Vol. 12, № 2. P. 143–148. <https://doi.org/10.1134/S2079057022020096>
7. Hermann W., Lambova S., Muller-Ladner U. Current Treatment Options for Osteoarthritis // Curr. Rheumatol. Rev. 2018. № 2 (14). P. 108–116.
8. Jiang X., Huang X., Jiang T. et al. The role of Sox9 in collagen hydrogel-mediated chondrogenic differentiation of adult mesenchymal stem cells (MSCs) // Biomater. Sci. 2018. № 6 (6). P. 1556–1568.
9. Khokhlov A.N. Does aging need its own program, or is the program of development quite sufficient for it? Stationary cell cultures as a tool to search for anti-aging factors // Curr. Aging Sci. 2013. № 1 (6). P. 14–20.
10. Khokhlov A.N., Klebanov A.A., Karmushakov A.F. et al. Testing of geroprotectors in experiments on cell cultures: Choosing the correct model system // Moscow University Biol. Sci. Bul. 2014. № 1 (69). P. 10–14.
11. Lefebvre V., Angelozzi M., Haseeb A. SOX9 in cartilage development and disease // Curr. Opin. Cell Biol. 2019. Vol. 61. P. 39–47.
12. Mohammed M., Lai T.-S., Lin H.-C. Substrate stiffness and sequence dependent bioactive peptide hydrogels influence the chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells // J. Mater. Chem. B. 2021. № 6 (9). P. 1676–1685.
13. Posey K.L., Coustry F., Hecht J.T. Cartilage oligomeric matrix protein: COMPOpathies and beyond // Matrix Biol.: J. Int. Soc. Matrix Biol. 2018. Vol. 71–72. P. 161–173.
14. Rodriguez-Merchan E.C. Regeneration of articular cartilage of the knee // Rheumatol. Int. 2013. № 4 (33). P. 837–845.
15. Roughley P.J., Mort J.S. The role of aggrecan in normal and osteoarthritic cartilage // J. Exper. Orthop. 2014. № 1 (1). С. 8.
16. Sahu N., Budhiraja G., Subramanian A. Preconditioning of mesenchymal stromal cells with low-intensity ultrasound: influence on chondrogenesis and directed SOX9 signaling pathways // Stem Cell Res. Ther. 2020. № 1 (11). P. 6.
17. Schnevoigt J., Fabian C., Leovsky C. et al. In Vitro Expression of the Extracellular Matrix Components Aggrecan, Collagen Types I and II by Articular Cartilage-Derived Chondrocytes // Anatomia Histol. Embryol. 2017. № 1 (46). P. 43–50.
18. Thomas N., Krishnapillai R., Bindhu P.R., Thomas P. Immunohistochemical expression of cyclooxygenase-2 in oral squamous cell carcinoma // Indian J. Dent. Res. 2019. Vol. 30, № 1. P. 102–106. [https://doi.org/10.4103/ijdr.IJDR\\_362\\_17](https://doi.org/10.4103/ijdr.IJDR_362_17)
19. Yang M., Deng R.-H., Yuan F.-Z. et al. Immunomodulatory PEG-CRGD Hydrogels Promote Chondrogenic Differentiation of PBMSCs // Pharmaceutics. 2022. № 12 (14). P. 2622.
20. Yaylaci S., Guler M.O., Tekinay A.B. Sulfated GAG mimetic peptide nanofibers enhance chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells in 3D in vitro models // Regen. Biomater. 2022. Vol. 10. rbac084. <https://doi.org/10.1093/rb/rbac084>.
21. Yu C.-Y., Huang W., Li Z.-P. et al. Progress in Self-assembling Peptide-based Nanomaterials for Biomedical Applications // Curr. Topics Med. Chem. 2016. № 3 (16). P. 281–290.
22. Young K., Morrison H. Quantifying Microglia Morphology from Photomicrographs of Immunohistochemistry Prepared Tissue Using ImageJ // J. Vis. Exp. 2018. Vol. 136. P. 57648. <https://doi.org/10.3791/57648>.

Поступила в редакцию 22.03.2023

После доработки 05.04.2023

Принята к публикации 14.04.2023

Adv. geront. 2023. Vol. 36. № 3. P. 383–390

S.N. Myakisheva<sup>1</sup>, N.S. Linkova<sup>1,2,3</sup>, A.S. Diatlova<sup>1,2</sup>, V.O. Polyakova<sup>1,2,3</sup>, G.A. Ryzhak<sup>1</sup>

### THE INFLUENCE OF PEPTIDES ON THE CHONDROGENIC DIFFERENTIATION OF HUMAN MESENCHYMAL STEM CELLS DURING REPLICATIVE AGING

<sup>1</sup> Saint-Petersburg Institute of Bioregulation and Gerontology, 3 Dynamo pr., 3, St. Petersburg 197110, e-mail: [ibg@gerontology.ru](mailto:ibg@gerontology.ru); <sup>2</sup> Saint-Petersburg Research Institute of Phthisiopulmonology, 2–4 Lygovsky pr., St. Petersburg 191036; <sup>3</sup> Belgorod State National Research University, 85 Pobedy str., Belgorod 308015

Osteoarthritis is a widespread age-related disease, that has no effective targeted therapy. In this regard, bioengineering methods are being actively developed that can stimulate the restoration of cartilage tissue. These methods include chondrogenic differentiation of stem cells, which is stimulated by various biomolecules, including short peptides and polypeptide complexes. It was studied the effect of the cartilage polypeptide complex (CPC) and AED

peptide on gene expression and protein synthesis of chondrogenic differentiation — SOX9, aggrecan, type II collagen and COMP — in human mesenchymal stem cell (MSC) during replicative aging. AED peptide at the concentration of 200 ng/ml activates gene expression and protein synthesis during aging of MSCs. CPC has the same effect in the concentration 2000 ng/ml. These data indicate the stimulating effect of studied peptides on regulation of chondrogenesis and open up prospects for further investigation of their effectiveness in osteoarthritis models.

**Key words:** *chondrogenesis, mesenchymal stem cells, peptides, replicative aging, osteoarthritis*