

ФИЗИОЛОГИЯ
ЖИВОТНЫХ И ЧЕЛОВЕКА

УДК 577.2

ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ СЕЛАНКА И ЕГО ФРАГМЕНТОВ

© 2019 г. С. В. Королева*, @, Н. Ф. Мясоедов*

*Институт молекулярной генетики РАН, пл. Академика Курчатова, 26, Москва, 123182 Россия

@E-mail: svr.koroleva@gmail.com

Поступила в редакцию 30.10.2017 г.

После доработки 09.04.2018 г.

Принята к публикации 11.04.2018 г.

Разработка препарата селанк на основе природного регуляторного пептида тафтсина позволила соединить нативную биоактивность молекулы с конструкторской инженерией определенных физиологических функций. На основании обобщения экспериментальных и клинических данных проведен сравнительный анализ структурно-функциональных закономерностей воздействия селанка и его фрагментов. В единую схему сведены качественные и количественные характеристики коррекционных процессов (анксиолитический, когнитивный, иммуностимулирующий, противоязвенный и др.), запускаемых пептидным препаратом и его аналогами. Предполагается, что влияние селанка на сеть каскадных процессов пептидов и медиаторов осуществляется через ключевую фигуру этой системы – энкефалин.

DOI: 10.1134/S0002332919040076

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ АСПЕКТЫ

Регуляторные пептиды (РП) и их фрагменты представляют собой эффективные программы управления различными физиологическими процессами организмов. Все они образуют верхний этаж иерархии регуляторных элементов и служат основой межклеточных взаимодействий различной модальности. С одной стороны, каждый пептид характеризуется уникальным сочетанием физиологических воздействий, а с другой – имеет перекрывающийся с остальными РП спектр биоактивностей. В совокупности множество РП образует эффективный функциональный континуум. Использование в терапевтических целях объектов этой системы позволяет создавать лекарства, действие которых максимально приближено к действию естественных механизмов управления с минимальными побочными эффектами. Однако выраженная полифункциональность олигопептидов может создавать ряд проблем при использовании их в качестве лекарственных препаратов. Именно поэтому особенно важно определить минимальную аминокислотную последовательность РП, ответственную за выполнение определенных физиологических функций (фармакофор). Такое картирование пептидных цепочек крайне необходимо для создания новых пептидов с определенным физиологическим профилем. Кроме того, известно, что интенсивный протеолиз, которому подвержены пептиды, резко ограничивает времен-

ной интервал функционирования препарата. Поэтому весьма актуальна задача пролонгирования действия РП. Возникает необходимость защищать важные функциональные участки олигопептида определенными последовательностями аминокислот без внесения в молекулу дополнительных сайтов для эндопептидаз.

Одна из отправных точек и опорных моделей пептидной инженерии – тетрапептид тафтсин Thr–Lyz–Pro–Arg. Это периферический регулятор иммунитета, который представляет собой короткий фрагмент тяжелой цепи иммуноглобулина G человека. На базе этого эндогенного регулятора был создан пептидный препарат селанк. В качестве протекторной последовательности с C-конца тафтсина было выбрано сочетание Pro–Gly–Pro. С одной стороны, этот трипептид – защитная группировка от действия протеаз, что позволяет пролонгировать действие пептида в несколько раз. С другой стороны, такой трипептид сам выполняет ряд дополнительных положительных функций. Более того, известно, что в организме непрерывно формируются подобные эндогенные регуляторы в виде глипролинов – продуктов метаболизма коллагена и эластина. Все это позволяет усилить нативность препарата селанка. Таким образом, последовательность селанка представляет собой гептапептид Thr–Lyz–Pro–Arg–Pro–Gly–Pro, который по сравнению со своим природным

аналогом оказывает гораздо более пролонгированное действие.

Цель работы — изучение всех известных на настоящий момент фармакофоров в молекулах тафтсина и селанка, ответственных за множественные центральные и периферические эффекты пептидов. Все эти функциональные активности препаратов были протестированы в различных лабораторных и клинических исследованиях.

ВЛИЯНИЕ НА НЕРВНУЮ СИСТЕМУ

Регуляция тревожности. В XXI в. — веке социальных проблем и перегрузки информационных каналов — на одно из первых мест выходит проблема регуляции тревожности. Было показано, что тревожные состояния находятся под многоуровневым контролем различных систем регуляции организма. Множество нейромедиаторов, а также различные нейрогуморальные процессы формируют сложную разветвленную сеть пусковых механизмов и их противовесов. Применение лекарственных препаратов заведомо синтетического профиля вызывает грубое нарушение всей тонкой настройки молекулярных механизмов. Так, в лечебной практике наиболее часто используются бензодиазепиновые транквилизаторы. Наряду с достижением целевой функции они вызывают целый ряд нежелательных побочных эффектов, например миорелаксацию, гипноседативный эффект, зависимость, синдром отмены, амнезию. Антидепрессанты и препараты других групп, назначаемые для купирования тревоги в сочетании с депрессией, запускают побочные процессы, обусловленные холинергическим, адренергическим и серотонинергическим механизмами.

Поиск и создание, с одной стороны, лекарственных препаратов, максимально приближенных к природным молекулярным агентам, а с другой стороны, достаточно узконаправленного и избирательного анксиолитического профиля и одновременно с различными мишенями действия, — одна из наиболее важных задач в фармакологии. К очевидным преимуществам фармакологических препаратов пептидной природы относятся: во-первых, их малая токсичность, так как они метаболизируются до аминокислот; во-вторых, тот факт, что они несут слепок с эндогенных регуляторов-олигопептидов, уже созданных самой природой и оптимизированных для сложной разветвленной сети регуляции статуса центральной нервной системы. Таким образом, пропадает негативный эффект грубого вклинивания в эндогенную сферу гомеостаза. Обнаружение у тафтсина эффекта снижения тревожности определило развитие направления, связанного с раз-

работкой селанка как анксиолитического препарата, тестированием его и его фрагментов-аналогов в доклинических и клинических испытаниях.

Было проведено обследование больных с разными формами тревожно-фобических расстройств невротического уровня (Зозуля и др., 2001). Авторы исследования показали, что селанк снижает поведенческие проявления тревоги и не вызывает характерных для большинства распространенных анксиолитиков побочных эффектов. В результате предварительного анализа больных (до применения селанка) было обнаружено выраженное снижение времени полужизни энкефалинов и суммарной энкефалиназной активности в плазме крови больных. Однако этот эффект наблюдался именно у больных с генерализованными тревожными расстройствами (ГТР), но отсутствовал у больных с паническими расстройствами. Было предположено, что это обусловлено относительно низкой концентрацией эндогенных ингибиторов энкефалиндеградирующих ферментов в крови больных с ГТР.

Высокая активность ферментов деградации эндогенных опиоидных пептидов определяет быстрое расщепление последних (для энкефалинов время полужизни в крови составляет 1–2 мин). К энкефалиндеградирующим ферментам сыворотки крови относятся аминопептидазы, обеспечивающие 70% общей энкефалиназной активности, и более специфичные к энкефалинам диамино- и дикарбоксипептидазы, такие, как эндопептидаза 24-11 (энкефалиназа В) и ангиотензинпревращающий фермент, или энкефалиназа А.

В то же время было выявлено, что селанк дозозависимо ингибирует скорость ферментативного гидролиза энкефалина в сыворотке крови. Концентрация пептида, при которой наблюдается 50%-ное ингибирование ферментов, составила 15 мкМ. Кроме того, эффективность селанка в ингибировании энкефалиназ была значительно более выражена, чем у известных ингибиторов пептидаз бацитрацина и пуромицина. Кроме самого гептапептида селанка ингибирующей способностью обладали также его пентапептидные фрагменты (Кост и др., 2001). Однако три-, тетра- и гексапептидные фрагменты такого действия не оказали.

Анализируя механизмы ингибирования энкефалиназ, можно предположить, что селанк взаимодействует с энкефалиндеградирующими ферментами сыворотки крови, являясь, подобно энкефалинам, их субстратом. Косвенным доказательством этого служат данные о том, что время полужизни селанка в крови составляет, как и у энкефалинов, несколько минут.

Были проведены клинические сравнительные исследования у больных с ГТР и неврастениями, где в качестве препарата сравнения был использован медазепам (Зозуля и др., 2008). В результате обследования оказалось, что анксиолитический эффект селанка сопоставим с действием медазепамы. Кроме того, стоит отметить важные и полезные побочные эффекты данного гептапептида. Так, в результате лечения селанком были выявлены антиастеническое и психостимулирующее воздействия на организм. В данных исследованиях был также проведен клинико-биологический анализ уровня энкефалинов в сыворотке крови. Было выявлено, что у больных с ГТР и неврастениями наблюдается пониженное содержание лейэнкефалина, которое коррелирует с длительностью заболевания и выраженностью ряда симптомов, отражающих проявления тревоги, астении, вегетативных расстройств. Клиническая эффективность селанка была сопоставлена с характеристиками его влияния на скорость гидролиза лейэнкефалина в сыворотке крови больных. Исследования показали, что при лечении селанком происходит увеличение содержания энкефалина (преимущественно у больных с ГТР). На основании полученных данных можно предположить, что эффект селанка связан с активацией опиоидной системы, усилением ее защитной роли в условиях повышенного уровня тревоги. В результате лечения медазепамом не обнаружено подобной зависимости.

ГАМК-эргическая система. Нормальная работа ЦНС основана на оптимальном балансе возбуждающей и тормозящей систем. Нарушение этого баланса приводит к развитию патологических состояний. Регуляция и терапия таких заболеваний обуславливают необходимость подробного исследования обеих систем.

Выраженное анксиолитическое воздействие селанка побудило провести исследования взаимодействия препарата с тормозящей системой, основной молекулярный представитель которой — гамма-аминомасляная кислота (ГАМК). Известно, что ГАМК оказывает успокаивающее действие, снижает возбуждение, уменьшает частоту сердечных сокращений, оказывает легкое гипотензивное, а также антигипоксическое и противосудорожное действия, повышает продуктивность мышления, положительно влияет на восстановление движений и речи, улучшает память. В настоящий момент известно множество аллостерических модуляторов работы ГАМК_A-рецепторов. Однако молекулярные механизмы, лежащие в основе таких взаимодействий, еще до конца не выяснены. К наиболее исследованным аллостерическим модуляторам ГАМК_A-рецепторов относятся бензодиазепины, которые широко применяются в

медицинской практике, однако обладают рядом нежелательных побочных эффектов. Таким образом, становится очевидной необходимость тестирования полезности и эффективности применения пептидных препаратов с минимальными побочными эффектами.

Были изучены селанк и его фрагмент Arg-Pro-Gly-Pro в целях определения возникновения прямых и опосредованных изменений основных параметров специфических лиганд-рецепторных взаимодействий ГАМК на плазматических мембранах нервных клеток мозга (Вьюнова и др., 2014). Было установлено, что наличие данных пептидов изменяет количество специфически связанного лиганда [³H]ГАМК. Предварительное интраназальное введение селанка также вызывало изменения числа мест специфического связывания [³H]ГАМК, но не влияло на аффинность рецепторов. Предварительное интраназальное введение фрагмента Arg-Pro-Gly-Pro вызывало более сложные отставленные во времени эффекты. Таким образом, были показаны эффекты пептидов на клеточные регуляторные механизмы, не связанные с лиганд-рецепторным взаимодействием.

Дофаминергическая система. В проведенных ранее исследованиях было обнаружено, что селанк, оказывающий выраженное анксиолитическое воздействие, не имеет негативных побочных (седативного и миорелаксирующего) эффектов, свойственных бензодиазепиновым транквилизаторам. Более того, было показано, что для селанка характерно транквилоактивирующее воздействие, механизмы которого еще мало исследованы. Для прояснения ситуации о способности селанка изменять состояние дофаминергической системы было проведено соответствующее исследование (Мешавкин и др., 2006). В данной работе изучалось воздействие пептида на индуцированные введением апоморфина поведенческие проявления гиперфункции дофаминергической системы. В результате анализа было выявлено, что введенный внутривентриально селанк (0.01, 0.1, 1 и 10 мг/кг) снижает вызванные апоморфином поведенческие проявления гиперфункции дофаминовой системы в тесте вертикализации мышей. Препарат сравнения в данных исследованиях — антипсихотик оланзапин, введенный в дозах, сопоставимых с терапевтическими (0.1 и 1 мг/кг). Оказалось, что эффект селанка сравним с эффектом оланзапина. Более того, было показано, что влияние селанка блокируется неселективным антагонистом опиоидных рецепторов налоксоном. Радиорецепторный анализ не обнаружил у селанка способности вытеснять неселективный антагонист D₂-дофаминовых рецепторов ³H-спиперон и лиганд δ- и

μ-опиоидных рецепторов ^3H -ДАДЛЭ из мест специфического связывания на мембранах головного мозга крыс. Таким образом, на основании полученных данных было предположено, что обнаруженный поведенческий эффект селанка опосредован его модулирующим действием на эндогенную опиоидную систему.

Процессы обучения и формирования памяти. Особый интерес вызывает оценка воздействия пептида на когнитивные процессы. Так, было проведено сравнительное изучение исходного пептида тафтсина, самого селанка и их фрагментов, образующихся при деградации, на процессы обучения и памяти (Козловская и др., 2001, 2002). Известно, что тафтсин подвергается деградации под влиянием тканевых пептидаз аминокислотидазы *N*, дипептидиламинопептидазы IV, пролилпептидазы или пролилэндопептидазы, попадающей в кровь в результате частичного гемолиза эритроцитов при стрессирующем воздействии. Кроме того, показано, что первичная деградация селанка может начинаться с C-концевого участка молекулы отщеплением группы Pro–Gly–Pro, подвергаясь дальнейшему гидролизу с образованием коротких фрагментов. Таким образом, в процессе деградации молекулы можно обнаружить достаточно большой спектр пептидных фрагментов различной длины. Выявление фармакофоров, ответственных за мнестические функции, представляет особый интерес для конструирования когнитивных пептидных лекарств. Для оценки влияния молекул на процессы обучения и памяти в исследовании использовали метод выработки условной реакции пассивного избегания (УРПИ).

Было установлено, что тафтсин проявлял лишь тенденцию к повышению способности животных к воспроизведению регистрируемых показателей обучения. В то же время сам селанк обладал выраженным, устойчивым и пролонгированным положительным влиянием на те же показатели. Все эти данные свидетельствуют об улучшенном запоминании экспериментальной ситуации, а также о сохранности выработанной реакции избегания электрораздражения.

Оценка эффектов фрагментов пептидов, полученных в результате отщепления отдельных аминокислот с C- и N-концов их молекул, позволила построить определенную “карту” соответствия позиции остатка определенной аминокислоты и эффективности действия на показатели УРПИ.

Так, относительное увеличение количества пролина в молекуле пептидов приводило к положительному влиянию соединения на показатели УРПИ. Пентапептид Pro–Arg–Pro–Gly–Pro, в составе молекулы которого содержится относи-

тельно большее по сравнению с другими изучаемыми пептидами количество фрагментов пролина, а также трипептид Pro–Gly–Pro оказывали выраженное оптимизирующее действие на регистрируемые показатели.

Содержание в молекуле пептидов аргинина существенно не отражалось на показателях выработки УРПИ, если аргинин находился между двумя остатками пролина. Однако присутствие в молекуле пептида аргинина, “не прикрытого” пролином, вызывало ухудшение всех показателей обучения.

Наличие треонина в молекуле изученных пептидов существенно не влияло на показатели выработки и сохранности УРПИ. Тем не менее отсутствие треонина на N-конце молекулы гексапептида Lys–Pro–Arg–Pro–Gly–Pro, несмотря на наличие трех остатков пролина, ухудшало влияние данного пептида на обучение при сравнении его действия с действием селанка, содержащего треонин.

Таким образом, пентапептид и гептапептид селанк обладали оптимальным действием на модели УРПИ в ряду изученных пептидных последовательностей.

ИММУНОМОДУЛИРУЮЩЕЕ ВОЗДЕЙСТВИЕ

Создание эффективных противовирусных препаратов, лишенных побочных негативных воздействий, в настоящее время весьма важная задача. Эндогенные пептиды, обладающие противовирусной активностью, – уникальная модель для разработки эффективных лекарств. Так как тафтсин обладает противовирусным воздействием, пристальное внимание было уделено исследованию противовирусного лекарственного потенциала селанка и его множественных фрагментов-аналогов.

Была изучена активность селанка в отношении вируса гриппа *A/Aichi2/68* (штамм H_3N_2) (Ершов и др., 2009). Эксперименты проводились в системах *in vitro* и *in vivo*. В качестве препарата сравнения использовали рекомбинантный интерферон-α (ИФН-α) в концентрации 10^4 МЕ/мл. В обоих случаях был обнаружен выраженный противовирусный эффект препарата. Оценка наибольшей эффективности пептида проводилась в двух режимах: согласно профилактической схеме применения, когда препарат добавлялся за 24 ч до заражения, и согласно лечебной схеме, когда препарат использовался уже после заражения. Селанк в концентрации 10^{-6} М, добавленный в культуру клеток по профилактической схеме, показал наибольшую

эффективность. Репродукция вируса была подавлена полностью. Более того, при этой схеме введения противовирусная активность селанка значительно превышала эффективность рекомбинантного ИФН- α .

Проведенные исследования в системе *in vivo* также показали, что наибольшая выживаемость лабораторных животных наблюдалась при введении препарата по профилактической схеме. В случае использования лечебной схемы применения селанка выяснилось, что концентрация препарата 100 мкг/кг оказалась эффективнее, чем концентрация 200 мкг/кг. Были проведены оценки клеточно-молекулярных показателей иммуномодулирующей активности. Так, применение селанка *in vivo* индуцировало экспрессию гена ИФН- α и интерлейкина-12 (ИЛ-12) (субъединицы *p35* и *p40*), не влияя при этом на экспрессию генов ИЛ-4, ИЛ-10 и фактора некроза опухоли α (ФНО α).

Таким образом, механизм противовирусного действия селанка связан с его способностью модулировать T α 1/T α 2/Treg-цитокинный баланс. Ранее было показано, что тафтсин реализует свое иммуномодулирующее действие через специфические рецепторы, локализованные на мембране полиморфно-ядерных лейкоцитов, моноцитов и периферических макрофагов. Авторы исследования предполагают, что селанк также может проявлять свой эффект, взаимодействуя с аналогичными рецепторами. Кроме того, воздействие пептида может быть опосредовано его влиянием на состояние ЦНС. Обобщая данные, можно заключить, что применение селанка усиливает экспрессию генов цитокинов, регулирующих развитие клеточно-опосредованных иммунных реакций (T α 1-цитокины) и стимулирующих противовирусный иммунитет (ИФН- α и ИФН- γ).

Анализируя взаимосвязь регуляторной роли цитокинов и развития психической патологии, стоит отметить, что отклонения в цитокиновом балансе были обнаружены при многих неврологических и психических заболеваниях. Например, повышенное содержание ИФН- γ , ИЛ-6, рецептора ИЛ-1 было выявлено у больных, страдающих депрессией. В плазме больных шизофренией было обнаружено повышенное содержание ИЛ-10. Кроме того, очень хорошо известна связь между психическим состоянием и восприимчивостью к инфекционным заболеваниям. Во множестве исследований было показано, что депрессия и другие психические расстройства приводят к подавлению естественных защитных механизмов. Более того, даже при воздействии кратковременных сильных психологических стрессоров наблюдаются изменения в продукции цитокинов и сни-

жение иммунореактивности, приводящие к реактивации латентных вирусных инфекций. Было показано, что препараты, используемые для лечения психических заболеваний, обладают иммунорегулирующими свойствами. Например, введение в культуральную среду кломипрамина и сертралина достоверно и разнонаправленно повлияло на митогенстимулированную секрецию ИФН- γ и ИЛ-10. Таким образом, данные антидепрессанты, увеличивая секрецию ИЛ-10 в культуре клеток, влияют на цитокиновый баланс, снижая соотношение ИФН- γ /ИЛ-10.

Было проведено исследование связи иммунорегулирующих свойств селанка и психических заболеваний (Учакина и др., 2008). Применение *in vitro* селанка (10^{-7} М) в культуральной среде полностью подавило экспрессию гена ИЛ-6 лейкоцитами периферической крови пациентов с депрессивными расстройствами, но не повлияло на экспрессию этого гена клетками крови здоровых доноров. В то же время было отмечено достоверное увеличение концентрации самого ИЛ-6, которое наблюдалось в культуральной среде периферической крови больных, культивируемой с селанком. Исходя из этих данных можно предположить, что селанк запускает некие сигнальные механизмы, действующие на продукцию белка ИЛ-6 по принципу обратной связи, стимулируя его экскрецию и одновременно блокируя экспрессию его гена. Поскольку повышенное содержание ИЛ-6 обычно сопряжено с депрессией, то блокировку трансляции гена ИЛ-6 следует рассматривать как выраженную защитную роль селанка. В то же время ИЛ-6 – активатор секреции противовоспалительного цитокина ИЛ-10, обладающего нейрорегенерирующими свойствами, которые проявляются в активации секреции фактора роста нейронов.

Также были проведены исследования взаимосвязи иммуотропных свойств селанка и психических заболеваний *in vivo*. В сыворотке крови больных с ГТР и неврастенией, принимающих селанк на протяжении 14 сут, были отмечены изменения в T α 1/T α 2-цитокинном балансе. Динамика этих изменений имела достоверную обратную корреляционную зависимость. Таким образом, обнаруженные цитокинрегулирующие свойства селанка позволяют рассматривать его в качестве иммуномодулятора для использования у людей с тревожно-астеническими заболеваниями. Также важно учитывать адаптогенные свойства этого пептида в случае применения его в условиях стрессиндуцирующих факторов окружающей среды для профилактики инфекционных заболеваний.

В исследовании различных функциональных профилей пептида всегда важно выявить фарма-

кофор. Для подробного картирования пептидных структур селанка и его аналогов в отношении их противовирусных активностей было синтезировано 17 новых пептидов (Андреева и др., 2010). Структуру фрагментов селанка создавали за счет последовательного усечения *N*- и *C*-концевых аминокислот. Кроме того, были созданы различные последовательности, гомологичные тафтсину и Pro–Gly–Pro. Исследования противовирусного эффекта препаратов (в концентрации 10^{-6} М) проводили как *in vitro*, так и *in vivo*. Были разработаны три схемы приема селанка и его аналогов: во-первых, применение пептидов до заражения вирусом в качестве профилактического средства, во-вторых, применение пептидов одновременно с вирусом как средства экстренной профилактики, в-третьих, применение пептидов после заражения вирусом уже в качестве лечебного препарата. Критерием сравнения было превышение противовирусной активности пептидов по сравнению со свойствами известных противовирусных препаратов. Было выявлено, что практически все изученные пептиды обладали выраженной противовирусной активностью, превосходящей таковую у препаратов сравнения. Этот эффект повторялся при различных концентрациях в условиях различного времени введения препарата. Кроме того, было определено, что наличие на *C*-конце молекулы остатков пролина и глицина обеспечивало выраженный противовирусный эффект. Так, минимальный фрагмент-фармакофор, ответственный за выраженный противовирусный эффект и сопоставимый с препаратами сравнения, – дипептид Gly–Pro.

Вызывает интерес исследование транскриптомного ответа организма на введение селанка и его аналогов, участвующих в регуляции воспалительных процессов. Была проведена оценка изменений экспрессии генов в гиппокампе и селезенке в ответ на однократное и курсовое введения селанка (Коломин и др., 2010). В результате исследования было выявлено, что при обоих режимах введения препарата более чем в 2 раза изменилась экспрессия пяти генов. Более того, количественная оценка показала, что в селезенке крысы эффект действия селанка на экспрессию пяти отобранных генов был выражен значительно сильнее, чем в гиппокампе. Кроме того, в результате исследования были найдены различия в эффективности двух режимов введения препарата. Так, при однократном введении пептида было отмечено наиболее сильное увеличение экспрессии генов (более чем в 4.5 раза). При курсовом же введении селанка воздействие на экспрессию было выражено слабее (не более чем в 2 раза). Позднее изучались эффекты селанка и уже двух его фрагментов

на экспрессию большего числа генов, вовлеченных в процессы воспаления (Kolomin *et al.*, 2011). Так, были проанализированы 84 гена селезенки мыши, связанных с молекулярными агентами воспалительных процессов. В результате исследования было выявлено, что при интраперитонеальной инъекции пептидных препаратов (100 мкг/кг) происходили значительные изменения 34 генов (*Bcl6* и др.), вовлеченных в воспалительные процессы.

Для более детального изучения иммуномодулирующей активности селанка было проведено исследование изменения экспрессии генов хемокинов и цитокинов в селезенке мыши под влиянием как целого пептида селанка, так и его фрагментов Gly–Pro, Arg–Pro–Gly–Pro и тафцина через 6 и 24 ч после однократного введения пептидов (Коломин и др., 2011). Было показано, что все препараты способны вызывать достоверные изменения в экспрессии генов хемокинов, цитокинов и их рецепторов в селезенке мыши во всех режимах введения пептидов. Более того, ранее найденный фармакофор Gly–Pro, обладающий выраженной противовирусной активностью, вызывал изменение уровня мРНК большинства рассмотренных генов.

Таким образом, можно заключить, что селанк обладает выраженной иммуностропной активностью. Способность этого пептида индуцировать секрецию интерферонов, защищающих клеточные культуры от цитопатического действия вирусов, позволяет надеяться на его эффективное применение в качестве противовирусного препарата, а также для купирования изменений психоиммунного статуса в условиях стресс-индуцирующих факторов и для развития адаптогенных свойств организма.

ВЛИЯНИЕ НА ЖЕЛУДОЧНО-КИШЕЧНЫЙ ТРАКТ

Известно, что повреждения желудочно-кишечного тракта возникают как вследствие дисбаланса центральных механизмов (стрессорные модели), так и при периферическом “прямом” повреждении слизистой оболочки. Направленный поиск противовязывенных препаратов, действующих комплексно на разные звенья патологического процесса, очень актуален. В этом случае важную роль играют разработки пептидных препаратов, в особенности пролинсодержащих молекул. Было проведено исследование влияния селанка и трех его фрагментов, полученных последовательным отщеплением аминокислотных остатков с *N*-конца молекулы, на различных моделях язвообразования (Павлов и др., 2004). Изучались способность и эффективность заживления язв при нару-

шениях гомеостаза слизистой оболочки желудка. В данной работе были использованы три экспериментальные модели язвообразования: этаноловая (акцент на периферических механизмах язвообразования), водоиммерсионно-иммобилизационная (стрессорная, акцент на центральных механизмах), ацетатная (изучение способности формирования и заживления язв). Исследование противоязвенного влияния селанка, а также трех его фрагментов показало, что все они эффективно действуют по двум направлениям, обуславливая протекторный эффект в виде повышения устойчивости слизистой оболочки желудка к действию различных ulcerогенных факторов и лечебный эффект в виде ускоренного процесса заживления язв.

Для оценки влияния глипролинов на экспрессию генов цитокинов было проведено исследование с использованием стрессорных и ацетатных моделей язвообразования (Сангаджиева и др., 2014). При интраназальном введении Pro-Gly-Pro (3.7 мкмоль/кг) оказал выраженное защитное действие на моделях стрессорного (59.4%) и ацетатного (78.5%) язвообразования у крыс. Было показано, что у контрольных животных в моделях стрессорных повреждений оболочки желудка в ряде случаев разрушение слизистой сопровождалось повышением транскрипции ФНО α и угнетением транскрипции интерлейкина ИЛ-4. В моделях ацетатных язв развитие повреждений коррелировало со снижением экспрессии генов ряда цитокинов: ИФН- α , ИФН- γ , ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-6, ИЛ-12 и ФНО α . В то же время наблюдалось защитное противоязвенное влияние Pro-Gly-Pro, которое сопровождалось повышением транскрипции ИЛ-6.

N-acetyl-Pro-Gly-Pro в отличие от Pro-Gly-Pro не уменьшал площадь стрессорных повреждений, однако характеризовался тенденцией предупредить развитие ацетатных язв. Кроме того, при использовании N-acetyl-Pro-Gly-Pro происходило нарастание экспрессии генов цитокинов Tx1 и Tx2 типа: ИФН- α , ИФН- γ , ИЛ-4.

ФИБРИНОЛИТИЧЕСКИЙ И ГИПОГЛИКЕМИЧЕСКИЙ ЭФФЕКТЫ

Глипролины Pro-Gly и Pro-Gly-Pro, которые были выбраны для формирования C-конца молекулы селанка, постоянно образуются в организме при синтезе и деградации коллагена и активно участвуют в регуляции системы гемостаза. Одно из заболеваний с выраженными системными нарушениями гемостатических параметров – диабет, при котором отмечается подавление функции противосвертывающей системы, повышение степени агрегации тромбоцитов, снижение ак-

тивности антикоагулянтной и фибринолитической систем. Кроме того, было показано, что фрагмент брадикинина, включающий в себя пептид Pro-Pro-Gly-Phe, ингибирует свертывающую активность тромбина и агрегацию тромбоцитов, индуцируемую тромбином. Был проведен ряд исследований с использованием диабетогенного метаболита аллоксана (Ульянов и др., 2009; Ляпина и др., 2010; Андреева и др., 2013), позволивший определить роль глипролинов и их аналогов в системе свертывания крови и тромбообразования. В результате экспериментов было обнаружено, что пролинсодержащие пептиды защищают организм животных от угрозы тромбообразования и оказывают антидиабетогенное и протектирующее антидиабетогенное действия. Многократное (в течение 7 сут) интраназальное введение пептида Pro-Gly-Pro-Leu животным (1 мг/кг) до инъекции им аллоксана обеспечивало эффективную защиту организма от развития инсулинзависимого сахарного диабета и предотвращало развитие гиперкоагуляционных изменений в системе гемостаза. В то же время на фоне предварительной инъекции аллоксана тот же пептид в тех же экспериментальных условиях замедлял развитие симптомов диабета. Многократное (7 сут, 1 мг/кг) интраназальное введение трипептида Pro-Gly-Arg до введения диабетогенной дозы аллоксана также обеспечивало эффективную защиту организма от развития инсулинзависимого сахарного диабета. Тетрапептид Pro-Gly-Pro-Arg не оказывал гипогликемического воздействия при провокации сахарного диабета.

Для формирования интеграционной концепции регуляторной роли глипролинов была проведена обобщающая исследовательская работа (Ляпина и др., 2013). В качестве двух опорных моделей были выбраны животные с инсулинзависимым аллоксановым диабетом (первого типа) и стойкой гипергликемией, подобной развитию инсулинзависимого диабета (второго типа) у человека. Было показано, что многократное интраназальное введение ди-, три- и тетрапептидов глипролинового ряда с дополнительным включением в разных положениях аргинина и лейцина вызывало как терапевтический, так и профилактический эффекты, а именно сочетанное нормогликемическое и антитромботическое изменения параметров крови.

КАСКАДНЫЕ ПРОЦЕССЫ

Как отмечено выше, при введении в организм селанка происходит увеличение содержания энкефалина. Такая активация опиоидной системы

может лежать в основе широкого диапазона влияний гептапептида на различные каскадные процессы, происходящие в организме.

Ранее мы детально проанализировали основной объем (за последние 40 лет) литературных источников для выявления возможных индуцирующих и ингибирующих влияний различных РП и ряда медиаторов (Королева, Мясоедов, 2012; Королева и др., 2012). Для определения роли каждого пептида в контроле физиологических функций была создана база данных представителей основных семейств РП и медиаторов, которая включила в себя учет направленности воздействия, различные дозы и способы введения молекул, виды организмов, рецепторные механизмы и др. При комплексном анализе всей обширной информации были выявлены многочисленные закономерности пептидного контроля процессов организма. Важную роль системоорганизующих факторов играют опиоиды, в частности лейэнкефалин. Этот пептид модулирует выход большинства других РП, а также таких важных медиаторов, как дофамин, серотонин, норадреналин, ацетилхолин и др. Ширина охвата спектра основных поведенческих и физиологических процессов позволяет отнести этот пептид к управленческой верхушке эндогенных регуляторов. Кроме того, лей-энкефалин входит в число факторов внутреннего подкрепления (ФВП). Эта система ФВП, определяющая уровень положительных эмоций, — поликомпонентная система со сложной сетью векторов каскадных воздействий, позволяющих формировать логические схемы подавления патофизиологических процессов.

Регулируя содержание энкефалина, селанк и его фрагменты имеют возможность расширения зоны влияния и выхода на широкий спектр крайне важных медиаторов и РП, а также на значительное число подконтрольных физиологических процессов. Все это позволяет сформировать длительные устойчивые индукционные каскады и увеличить терапевтический диапазон воздействий. Таким образом, максимально эффективно и максимально натурально (минимум побочных эффектов, так эта система уже отработана самой природой) можно приближаться к коррекции биологических процессов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Фундаментальные исследования при разработке различных фармакологических препаратов необходимо максимально приближать к поиску целевых объектов среди внутренних резервных молекулярных программ. Такой подход позво-

ляет выявить наиболее физиологичные молекулярные схемы регуляции биопроцессов. Основными направлениями дальнейшего развития разработки препаратов может быть как усиление уже имеющихся физиологических эффектов и введение новых свойств, так и устранение или уменьшение нежелательных эффектов, а также создание стабилизированных структур, более устойчивых к метаболической деградации (протеолизу). Все эти задачи были успешно решены при разработке препарата селанк. Данный пептид обладает выраженными анксиолитическим, антидепрессивным, стресспротекторным, когнитивным, иммуномодулирующим, противовирусным, противоязвенным, фибринолитическим, гипогликемическим эффектами. Наряду со столь обширным спектром лечебных воздействий селанк характеризуется высоким уровнем безопасности, так как метаболизируется до естественных аминокислот. Более того, селанк, имея максимально схожий биохимический профиль с двумя природными регуляторами тафтсином и производными коллагена, “тонко” встраивается в существующую систему регуляции физиологических функций, не вызывая грубого резкого изменения биопараметров, характерного для эффектов многих обычных лекарств. Особую научно-прикладную ценность имеют результаты изучения зависимости между структурой и физиологической активностью в ряду тафтсина, селанка и их многочисленных аналогов, позволившие картировать аминокислотные последовательности по направленности фармакологических эффектов.

Работа проводилась при частичной поддержке по плановому заданию НИР по теме: “Исследование структуры и функций природных пептидов с целью создания новых лекарственных препаратов”, № госрегистрации 01201355492 и по проекту: “Структурно-функциональное исследование эндогенных пептидов — основа создания новых фармакологически важных препаратов” в рамках Программы фундаментальных исследований Президиума РАН “Молекулярная и клеточная биология и постгеномные технологии”. Руководитель работ академик Н.Ф. Мясоедов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Андреева Л.А., Мясоедов Н.Ф., Ляпина Л.А., Григорьева М.Е., Оберган Т.Ю., Шубина Т.А. Действие пептида Pro-Gly-Pro на параметры гемостаза и жировой обмен в условиях гиперхолестеринемии у крыс // Докл. РАН. 2013. Т. 453. № 3. С. 346–349.
- Андреева Л.А., Нагаев И.Ю., Мезенцева М.В., Шаповал И.М., Подчерняева Р.Я., Щербенко В.Э., Потапова Л.А., Руссу Л.И., Ершов Ф.И., Мясоедов Н.Ф. Исследова-

- ние противовирусных свойств структурных фрагментов пептида селанк // Докл. РАН. 2010. Т. 431. № 3. С. 414–418.
- Вьюнова Т.В., Андреева Л.А., Шевченко К.В., Шевченко В.П., Мясоедов Н.Ф.* Пептидная регуляция специфических лиганд-рецепторных взаимодействий ГАМК на плазматических мембранах нервных клеток // Нейрохимия. 2014. Т. 31. № 4. С. 300–306.
- Еришов Ф.И., Учакин П.Н., Учакина О.Н., Мезенцева М.В., Алексеева Л.А., Мясоедов Н.Ф.* Активность иммуномодулятора селанка при экспериментальной гриппозной инфекции // Вопр. вирусологии. 2009. Т. 5. С. 19–24.
- Зозуля А.А., Кост Н.В., Соколов О.Ю., Габаева Н.В., Гривенников И.А., Андреева Л.А., Золотарев Ю.А., Иванов С.В., Андриященко Л.Н., Мясоедов Н.Ф., Смудевич А.Б.* Ингибирующий эффект селанка на активность энкефалиндеградирующих ферментов как один из возможных механизмов его анксиолитического действия // Бюл. эксперим. биологии и медицины. 2001. Т. 131. № 4. С. 376–378.
- Зозуля А.А., Незнамов Г.Г., Сюняков Т.С., Кост Н.В., Габаева М.В., Соколов О.Ю., Серебрякова Е.В., Сиранчиева О.А., Андриященко А.В., Телешева Е.С., Сюняков С.А., Смудевич А.В., Мясоедов Н.Ф., Середенин С.Б.* Эффективность и возможные механизмы действия нового пептидного анксиолитика селанка при терапии генерализованного тревожного расстройства и неврастении // Журн. неврологии и психиатрии. 2008. Т. 4. С. 38–48.
- Козловская М.М., Середенин С.Б., Козловский И.И., Вальдман Е.А., Андреева Л.А., Мясоедов Н.Ф.* Сравнительное изучение фрагментов тафтсина на показатели условной реакции пассивного избегания // Хим.-фармацевт. журн. 2001. Т. 35. № 3. С. 3–5.
- Козловская М.М., Середенин С.Б., Козловский И.И., Вальдман Е.А., Андреева Л.А., Мясоедов Н.Ф.* Сравнительный анализ структурно-функциональных особенностей пептидного препарата селанк // Психофармакология и биол. наркология. 2002. Т. 2. № 1–2. С. 203–210.
- Коломин Т.А., Шадрин М.И., Сломинский П.А., Лимборская С.А., Мясоедов Н.Ф.* Изменение экспрессии генов хемокинов, цитокинов и их рецепторов под действием селанка и его фрагментов // Генетика. 2011. Т. 47. № 5. С. 711–714.
- Коломин Т.А., Шадрин М.И., Агнуллин Я.В., Шрам С.И., Сломинский П.А., Лимборская С.А., Мясоедов Н.Ф.* Транскриптомный ответ клеток гиппокампа и селезенки крысы на однократное и курсовое введение пептида селанка // Докл. РАН. 2010. Т. 430. № 1. С. 127–129.
- Королева С.В., Мясоедов Н.Ф.* Динамическая иерархия регуляторных пептидов. Структура индукционных связей регуляторов как мишень для терапевтических воздействий // Успехи физиол. наук. 2012. Т. 43. № 3. С. 38–47.
- Королева С.В., Николаева А.А., Ашмарин И.П.* Типы биоинформационных программ внутри континуума регуляторных пептидов и непептидных медиаторов. Особенности взаимодействия дофаминовой и серотониновой систем // Нейрохимия. 2012. Т. 29. № 2. С. 150–161.
- Кост Н.В., Соколов О.Ю., Габаева Н.В., Гривенников И.А., Андреева Л.А., Мясоедов Н.Ф., Зозуля А.А.* Ингибирующее действие семакса и селанка на энкефалиндеградирующие ферменты сыворотки крови человека действия // Биоорг. химия. 2001. Т. 27. № 3. С. 180–183.
- Ляпина Л.А., Мясоедов Н.Ф., Григорьева М.Е., Шубина Т.А., Андреева Л.А.* Современная концепция регуляторной роли пептидов глипролинового ряда в коррекции функции системы гемостаза при развитии сахарного диабета // Изв. РАН. Сер. биол. 2013. № 4. С. 453–462.
- Ляпина Л.А., Мясоедов Н.Ф., Андреева Л.А., Ульянов А.М., Оберган Т.Ю., Шубина Т.А., Пасторова В.Е.* Фибринолитический и гипогликемический эффекты пептида Pro-Gly-Pro-Leu при развитии инсулинзависимого диабета у крыс // Изв. РАН. Сер. биол. 2010. № 3. С. 375–379.
- Мешавкин В.К., Кост Н.В., Соколов О.Ю., Золотарев Ю.А., Мясоедов Н.Ф., Зозуля А.А.* Блокируемый налоксоном депримирующий эффект анксиолитика селанка на апоморфининдуцированные поведенческие проявления гиперфункции дофаминовой системы // Бюл. эксперим. биологии и медицины. 2006. Т. 142. № 11. С. 545–548.
- Павлов Т.С., Самонина Г.Е., Андреева Л.А., Мясоедов Н.Ф., Ашмарин И.П.* Новое свойство синтетического анксиолитика селанка и его дериватов // Докл. РАН. 2004. Т. 397. № 4. С. 563–565.
- Сангаджиева А.Д., Бакаева З.В., Самонина Г.Е., Мезенцева М.В., Андреева Л.А., Мясоедов Н.Ф.* Влияние глипролинов PGP и N-acetyl-PGP на экспрессию генов цитокинов при стрессорном и ацетатном язвобразовании // Вестн. МГУ. Сер.16, Биология. 2014. Т. 16. № 4. С. 3–8.
- Ульянов А.М., Ляпина Л.А., Оберган Т.Ю., Шубина Т.А., Пасторова В.Е., Андреева Л.А., Мясоедов Н.Ф., Ашмарин И.П.* Антидиабетогенное действие пептидов Pro-Gly-Arg и Pro-Gly-Pro-Arg при их многократном интраназальном введении животным // Изв. РАН. Сер. биол. 2009. № 6. С. 740–744.
- Учакина О.Н., Учакин П.Н., Мясоедов Н.Ф., Андреева Л.А., Щербенко В.Э., Мезенцева М.В., Габаева М.В., Соколов О.Ю., Зозуля А.А., Еришов Ф.И.* Иммуномодулирующее действие селанка у больных с тревожно-астеническими расстройствами // Журн. неврологии и психиатрии. 2008. Т. 108. № 5. С. 71–75.
- Kolomin T., Shadrina M., Andreeva L., Slominsky P., Limborska S., Myasoedov N.* Expression of inflammation-related genes in mouse spleen under tuftsin analog Selandan // Regul. Peptides. 2011. V. 170. P. 18–23.

Physiological Effects of the Selank and Its Fragments

S. V. Koroleva^{1, #} and N. F. Mjasoedov¹

¹*The Institute of Molecular Genetics of the Russian Academy of Sciences, pl. Kurchatova 2, Moscow, 123182 Russia*

[#]*e-mail: svr.koroleva@gmail.com*

Development of the Selank based on the natural regulatory peptide tuftsin allowed to combine the native bio-activity of the molecule with the design engineering of certain physiological functions. Based on a summary of experimental and clinical data, a comparative analysis of the structural and functional regularities of the Selank and its fragments was carried out. Qualitative and quantitative characteristics of correctional processes (anxiolytic, cognitive, immunostimulating, anti-ulcer, etc.), triggered by a peptide preparation and its analogues, are summarized into a single scheme. It is assumed that the influence of Selank on the network of cascade processes of peptides and mediators is carried out through the key figure of this system, enkephalin.