

РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК
ИНСТИТУТ ФИЗИОЛОГИИ им. И.П. ПАВЛОВА

ГЕРОНТОЛОГИЧЕСКОЕ ОБЩЕСТВО

САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКИЙ ИНСТИТУТ
БИОРЕГУЛЯЦИИ И ГЕРОНТОЛОГИИ

В.Х. ХАВИНСОН Р.С. УМНОВ
Н.С. ЛИНЬКОВА А.В. АРУТЮНЯН

**МОЛЕКУЛЯРНО-КЛЕТОЧНЫЕ
МЕХАНИЗМЫ
ПЕПТИДЕРГИЧЕСКОЙ
РЕГУЛЯЦИИ
ФУНКЦИЙ МОЗГА**



МОСКВА НАУКА 2018

УДК 579; 616
ББК 28.072
X12

Рецензенты:

член-корреспондент РАН *Н.М. Аничков*,
член-корреспондент РАН *Б.Ф. Ванюшин*,
член-корреспондент РАН *Д.П. Дворецкий*

Хавинсон В.Х., Умнов Р.С., Линькова Н.С., Арутюнян А.В.

Молекулярно-клеточные механизмы пептидергической регуляции функций мозга / В.Х. Хавинсон, Р.С. Умнов, Н.С. Линькова, А.В. Арутюнян; Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН ; Геронтологическое общество РАН ; Санкт-Петербургский институт биорегуляции и геронтологии. – М. : Наука, 2018. – 222 с. – ISBN 978-5-02-040165-5.

Препараты, используемые для лечения патологии головного мозга, в том числе и у людей пожилого и старческого возраста, относятся к разным фармакологическим группам. Среди них выделяют антиоксиданты, блокаторы оксида азота, вещества, подавляющие процессы перекисного окисления липидов, и др. В настоящее время перспективными нейропротекторами являются короткие пептиды, обладающие высокой физиологической активностью и отсутствием побочных эффектов. Монография посвящена одной из новых разработок Санкт-Петербургского института биорегуляции и геронтологии – нейропротекторному пептиду EDR (Glu-Asp-Arg). Обобщены результаты молекулярно-клеточных аспектов нейропротекторных эффектов пептида EDR. Отмечено, что в модели диссоциированных культур нейронов коры головного мозга крыс пептид EDR регулирует экспрессию сигнальных молекул – маркеров функциональной активности клеток – серотонина и проапоптотического протеина p53. Кроме того, показано, что в моделях болезни Альцгеймера и Хантингтона пептид EDR восстанавливает количество дендритных шипиков нейронов, что характеризует его способность нормализовывать межнейронные взаимодействия. Нейропротекторная роль пептида EDR проявляется при экспериментальной пренатальной гипоксии и гипергомоцистеинемии. Пептид EDR снижает накопление активных форм кислорода в нейронах, повышая их устойчивость к окислительному стрессу и предотвращая взаимодействие гомоцистеина и его производных с рецепторами глутамата. Обосновывается предположение о том, что выявленные нейропротекторные эффекты пептида EDR связаны с его способностью проникать в ядро и ядрышко клеток, связываться с ДНК или гистоновыми белками и таким образом регулировать экспрессию генов и синтез белков, реализующих функции нейронов головного мозга. Пероральное применение пептида EDR способствовало регуляции экспрессии гена белка теплового шока и повышало физическую активность и работоспособность у спортсменов, а у лиц пожилого возраста нормализовывало память и психоэмоциональное состояние.

Для широкого круга специалистов, врачей-неврологов и гериатров, специалистов в области молекулярной биологии, биофизики, клеточных технологий и биоинформатики.

ISBN 978-5-02-040165-5

© Хавинсон В.Х., Умнов Р.С., Линькова Н.С.,
Арутюнян А.В., 2018

© ФГУП Издательство «Наука», редакционно-
издательское оформление, 2018

Предисловие

По прогнозам ООН к середине XXI столетия продолжительность жизни в мире увеличится в среднем на 5 лет. Таким образом доля пожилых людей в общей численности населения значительно увеличится. Учитывая увеличение вероятности развития нейродегенеративных заболеваний у лиц старше 70 лет, можно прогнозировать, что в недалеком будущем патология центральной нервной системы выйдет на первый план и приобретет острую социальную значимость. Прогноз Всемирной организации здравоохранения свидетельствует о трехкратном увеличении к 2050 году количества больных, страдающих нейродегенеративными заболеваниями.

Нейродегенеративные заболевания характеризуются прогрессирующей гибелью нейронов мозга. Согласно классическим представлениям, основной причиной гибели нейронов головного мозга, например при болезни Альцгеймера, является формирование внеклеточных амилоидных бляшек и внутриклеточных нейрофибриллярных клубков в результате нарушения фолдинга β -амилоида и τ -протеина. Имеется мнение, что одной из причин некорректного сворачивания β -амилоида является окислительный стресс. Кроме того, в ряде исследований показано, что при болезни Паркинсона наблюдаются мутации митохондриальной ДНК, приводящие к дефекту белков электрон-транспортной цепи и, следовательно, к окислительному повреждению нейронов. Учитывая тот факт, что латентный период нейродегенеративных заболеваний может достигать 20 лет, нельзя исключать, что окислительный стресс и гипоксия могут способствовать прогрессированию гибели нейронов. Следовательно, развитие нейродегенеративных заболеваний может быть сопряжено с окислительным стрессом.

Ввиду этого поиск веществ, сочетающих в себе нейропротекторные, антиоксидантные свойства и эффективных при лечении нейродегенеративных заболеваний, является актуальной задачей геронтологии и предиктивной молекулярной медицины.

Представленная монография – результат обобщения многолетних исследований, посвященных изучению молекулярно-клеточных аспектов нейропротекторного действия пептида EDR в от-

ношении нейродегенеративных заболеваний, а также состояний, связанных с окислительным стрессом и нарушением функций центральной нервной системы. В монографии описано влияние пептида EDR на экспрессию сигнальных молекул головного мозга, морфологию нейронов в моделях болезни Альцгеймера и Хантингтона, приведены результаты исследований эффективности пептида EDR на животных при воздействии экстремальных факторов внешней среды, сопровождающихся гипоксией. Одна из глав монографии посвящена объяснению эффективности пептида EDR с точки зрения его биофизического взаимодействия с ДНК и гистоновыми белками. В завершающих главах монографии рассматривается эффективность применения пероральной формы пептида EDR у спортсменов и лиц пожилого возраста.

Академик РАН А.Д. Ноздрачев

Принятые сокращения и определения

а.о	– азотистое основание
АД	– артериальное давление
АЛТ	– аланинаминотрансфераза
АСТ	– аспаратаминотрансфераза
АОЗ	– антиоксидантная защита
АФК	– активная форма кислорода
БА	– болезнь Альцгеймера
БАС	– боковой амиотрофический склероз
БВ	– биологический возраст
БТШ	– белки теплового шока
БХ	– болезнь Хантингтона
ГАМК	– гамма-аминомасляная кислота
ГГЦ	– гипергомоцистеинемия
ГнРГ	– гонадотропин-рилизинг-гормон
ГП	– глутатионпероксидаза
ГЦ	– гомоцистеин
ГЦК	– гомоцистеиновая кислота
ДА	– дофамин
ДГБА	– дигидроксибензиламин
ДНК	– дезоксирибонуклеиновая кислота
ДОФА	– 3,4-диоксифенилаланин
ДЭ	– дисциркуляторная энцефалопатия
ИУ	– индекс ухаживания
ИУН	– индекс ухаживания самцов, не имеющих опыта полового поведения
ИУТ	– индекс ухаживания самцов, прошедших тренировку
КА	– катехоламин

КрК	– креатинкиназа
ЛДГ	– лактатдегидрогеназа
ЛП	– липопротеин
мРНК	– матричная рибонуклеиновая кислота
МПО	– медиальная преоптическая область
НАДН	– никотинамидадениндинуклеотид
НАДФН	– никотинамидадениндинуклеотидфосфат
НДЗ	– нейродегенеративные заболевания
ОГМП	– ослабленное геомагнитное поле
ПААГ	– полиакриламидный гель
ПОЛ	– перекисное окисление липидов
ПСФ	– психофизиологический тест
ПЦР	– полимеразная цепная реакция
ПЭС	– психоэмоциональное состояние
РДО	– реакция на движущиеся объекты
РНК	– рибонуклеиновая кислота
САН	– методика диагностики оценки самочувствия, активности и настроения
СОД	– супероксиддисмутаза
СРО	– свободнорадикальное окисление
ССС	– сердечно-сосудистая система
СШН	– средние шипиковые нейроны
УРПУ	– условно-рефлекторное подавление ухаживания
ХЛ	– хемилюминесценция
ЦВ	– циркадианное время
ЦНС	– центральная нервная система
ЦПД	– цветовая психодиагностика
ЧСС	– частота сердечных сокращений
ЭКГ	– электрокардиография
ЭЭГ	– электроэнцефалография
Å	– ангстрем (Ångström, швед.)
η r	– относительная вязкость (relative η)
A β	– β -амилоид
ADAM	– дезинтегрин и металлопротеиназа (short for a disintegrin and metalloproteinase)

Adh	– алкогольдегидрогеназа (alcohol dehydrogenase)
Agnst	– мутант локуса AGNostic с температурной чувствительностью (temperature sensitive)
APP	– белок-предшественник бета-амилоида (amyloid precursor protein)
Ara-C	– цитозин β -D-арабинофуранозид, ингибитор пролиферации (cytosine β -D-arabinofuranoside)
BACE	– бета-секретаза (beta-site amyloid precursor protein cleaving enzyme)
BDNF	– мозговой нейротрофический фактор (brain-derived neurotrophic factor)
BSA	– бычий сывороточный альбумин (bovine serum albumin)
CNG	– цитозин-нуклеотид-гуанин
CALM	– ген кальмодулина (calmodulin)
CD	– кластер дифференцировки (cluster of differentiation)
CG	– последовательность нуклеотидов цитозин-гуанин
CPP	– класс пептидов, проникающих через мембрану клетки (cell-penetrating peptides)
CTF	– С-концевой фрагмент (C-terminal fragment)
CS	– линия мух Canton-S
DCFH-DA	– карбоксиметокси-2',7'-дихлордигидрофлуоресцеин диацетат (2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate)
DAPI	– 4,6-диамидино-2-фенилиндол (4',6-diamidino-2-phenylindole)
DARPP-32	– нейрональный фосфопротеин (32-kD dopamine and cAMP regulated neuronal phosphoprotein)

DB	– буфер для диссекции (dissection buffer)
DMEM	– питательная среда (Dulbecco modified Eagle's minimal essential medium)
DPBS	– фосфатно-солевой буферный раствор Дульбекко (Dulbecco's phosphate-buffered saline)
E	– энергия
E_{tot}	– полная (total) потенциальная энергия
E_{str}	– энергия деформации (strain)
E_{vdw}	– энергия ван-дер-ваальсовых (van der Waals) взаимодействий
E_{ele}	– энергия электростатического (electrostatic) взаимодействия
EDR	– трипептид Glu-Asp-Arg (Пинеалон)
EDTA	– этилендиаминтетрауксусная кислота (ethylenediaminetetraacetic acid)
ERK 1/2	– внеклеточная регулируемая киназа в двух изоформах (extracellular regulated kinase, 2 isoforms)
EtBr	– бромистый этидий (ethidium bromide)
Fbp	– жировой белок тела (fat body protein)
FBS	– фетальная бычья сыворотка (fetal bovine serum)
FITC	– флуоресцинизоотиоцианат (fluorescein isothiocyanate)
FP	– прямой праймер (forward primer)
GFP	– зеленый флуоресцирующий белок (green fluorescent protein)
GPX	– глутатионпероксидаза (glutathione peroxidase)
H	– семейство гистоновых белков (histones)
HBSS	– сбалансированный солевой раствор Хэнкса (Hanks' balanced salt solution)

HeLa	– линия иммортализованных клеток, впервые выделенных от женщины по имени Henrietta Lacks
HEPES	– буферный агент, 4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновая кислота (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid)
HIV	– вирус иммунодефицита человека (human immunodeficiency virus)
HRP	– пероксидаза хрена (horseradish peroxidase)
HSPA1A	– белок теплового шока (heat shock protein family A member 1A)
Htt	– белок хантингтин
HTT	– ген белка хантингтина
IFNG	– ген гамма-интерферона (interferon gamma)
IL2RB	– ген бета-рецептора интерлейкина 2 (interleukin 2 receptor beta)
KED	– трипептид Lys-Glu-Asp (Везуген), вазопротектор
Ki67	– пролиферативный фактор
limk1	– ген, кодирующий белок LIMK1
LIMK-1	– LIM домен киназы 1
mHtt	– мутантный белок хантингтин
MAPs	– семейство структурных фибриллярных белков, связывающихся с микротрубочками (microtubule-associated proteins)
МАРТ	– τ-протеин, ассоциированный с микротрубочками (microtubule associated protein tau)
NAS	– N-ацетилсеротонин (N-Acetylserotonin)
NBA	– среда для нейрональных культур (Neurobasal-A)
NFT	– нейрофибрилярный клубок (neurofibrillary tangle)
NGF	– фактор роста нервов (nerve growth factor)
p53	– транскрипционный фактор, антионкопротеин

park	– ген, кодирующий белок PARK
pH	– водородный показатель, кислотность (pondus Hydrogenii)
PBS	– фосфатно-солевой буферный раствор (phosphate-buffered saline)
PC12	– феохромоцитома (pheochromocytoma)
PDB	– электронная база белковых структур (The Protein Data Bank)
PFA	– параформальдегид (paraformaldehyde)
PHF	– парный спиральный филамент (paired helical filament)
PI	– йодистый пропидий (propidium iodide)
PPARs	– семейство рецепторов, активирующих проли- ферацию пероксисом (peroxisome proliferator-activated receptors)
PrP	– прионный белок (prion protein)
PrPsc	– неправильно свернутый прионный белок (scrapie – почесуха – первое заболевание прион- ной природы, выявленное у овец)
PVDF	– поливинилиденфторид (polyvinylidene difluoride)
REST	– транскрипционный фактор (repressor element-1 Silencing Transcription factor)
rok	– ген, кодирующий белок ROK
RP	– обратный праймер (reversed primer)
sAPP	– внеклеточный N-концевой домен белка-пред- шественника β -амилоида
SDS	– додецилсульфат натрия (sodium dodecyl sulfate)
SkQ	– ионы Скулачева
SOD	– супероксиддисмутаза (superoxide dismutase)

Таq-полимераза	– термостабильная ДНК-полимераза бактерии <i>Thermus aquaticus</i>
ТВ	– буфер для растирания (trituration buffer)
ТРН	– ген триптофангидроксилазы (tryptophan hydroxylase)
У/л	– ед./л = единиц на литр (unit per liter)
ВИМ	– ген виментина (vimentin)
YAC128	– трансгенная линия мышей, несущих мутантный человеческий ген НТТ в составе искусственной дрожжевой хромосомы (yeast artificial chromosome)

Свидетельства о государственной регистрации пептидных биорегуляторов

Название пептидного биорегулятора	№ свидетельства о государственной регистрации
Пинеалон	№ RU.77.99.11.003.E.005060.04.14
Везуген	№ RU.77.99.11.003.E.005063.04.14
Панкраген	№ RU.77.99.32.003.E.004994.03.15
Кристаген	№ RU.77.99.11.003.E.005065.04.14

Введение

У людей старше 60 лет в различных зонах центральной нервной системы достаточно часто наблюдаются дегенеративные изменения. В частности, почти на 1/3 уменьшается число нервных волокон. При сочетании возрастного снижения функциональной активности головного мозга с сосудистой патологией или с наличием в анамнезе черепно-мозговых травм могут возникать дисциркуляторная энцефалопатия, инсульт, деменция и эпилепсия, которые являются причинами социальной дезадаптации и смертности у лиц старших возрастных групп.

По данным Всемирной организации здравоохранения на 2017 год, цереброваскулярные заболевания занимают 3 место среди причин смертности. При этом средняя частота встречаемости инсульта в развитых странах составляет около 2500 случаев на 1 млн населения в год. Особенно высок риск развития инсульта у пациентов, достигших 55-летнего возраста. С каждым последующим десятилетием вероятность развития инсульта у таких пациентов возрастает почти в 2 раза. Частота деменции среди лиц в возрасте старше 65 лет составляет от 5 до 15%. В начале XXI века эти показатели увеличились почти в 1,5 раза. Кроме того, в экономически развитых странах деменция, в частности болезнь Альцгеймера, занимает 4 место среди причин смертности. Согласно данным Всемирной организации здравоохранения (2017 г.), в мире ориентировочное число пациентов с деменцией составляет 50 млн человек.

Для лечения патологии головного мозга в настоящее время используются препараты разных фармакологических групп. К основным препаратам относятся антиоксиданты, антигипоксанты, блокаторы оксида азота. Однако перспективными нейропротекторами, обладающими низкой иммуногенностью и высокой физиологической активностью, являются пептиды. По составу их можно разделить на 2 группы: полипептидные комплексы, выделенные из мозга крупного рогатого скота или свиней (кортексин, церебролизин и др.), и короткие синтетические пептиды (семакс, кортаген, пептид EDR и др.).

Разработанный в Санкт-Петербургском институте биорегуляции и геронтологии полипептидный препарат Кортексин широко применяется в лечении нарушений функций головного мозга у людей разного возраста. В основе молекулярного механизма действия Кортексина — его способность активировать экспрессию генов, отвечающих за синтез собственных нейротрофических факторов, таких как мозговой нейротрофический фактор (BDNF) и фактор роста нервов (NGF). Наряду с Кортексином в Санкт-Петербургском институте биорегуляции и геронтологии был сконструирован и синтезирован пептид EDR, также обладающий выраженным нейропротекторным эффектом. Сочетанное пероральное применение пептида EDR с вазопротекторным пептидом KED показало свою эффективность у больных с черепно-мозговой травмой и церебростенией. Кроме того, пептид EDR обладает выраженным антиоксидантным действием и способствует повышению экспрессии гена стрессоустойчивости HSPA1A. Предполагается, что молекулярный механизм биологической активности пептида EDR, как и ряда других коротких пептидов, связан с эпигенетической регуляцией экспрессии ряда генов и синтеза соответствующих белков.

Глава 1

Пептид EDR – регулятор экспрессии сигнальных молекул в культурах нейронов головного мозга

В данной главе описаны методология и результаты сравнительного изучения влияния пептидов EDR, KED и полипептидного комплекса кортексина на экспрессию сигнальных молекул (p53, виментина, серотонина, кальмодулина) в клетках коры головного мозга крыс.

1.1. Сигнальные молекулы – маркеры функциональной активности головного мозга

Сигнальные молекулы, участвующие в поддержании гомеостаза, являются основным объектом исследований современной биологии, медицины и мишенями для многих фармакологических препаратов. Выяснение процессов, лежащих в основе регуляции гомеостаза, с помощью эндо- и экзогенных веществ позволяет более успешно решать вопросы диагностики, лечения и профилактики многих заболеваний, в том числе и связанных со старением. Экспрессия многих сигнальных молекул в головном мозге с возрастом изменяется. Инволютивные процессы, связанные со старением, затрагивают и клеточные системы, осуществляющие укладку белковых цепей и их катаболизм, что приводит к снижению чувствительности гипоталамуса к регуляторным сигналам. Усиление с возрастом действия окислительного стресса (образования свободных радикалов) и накопление поврежденных окислением молекул (белков, нуклеиновых кислот и липидов) провоцируют множественную дисфункцию сигнальных путей. Одними из важнейших молекул, характеризующих функциональную активность

нейронов головного мозга, являются проапоптотический белок p53, виментин, серотонин и кальмодулин.

Белок p53 – транскрипционный фактор, выполняющий функцию супрессора образования злокачественных опухолей путем активации апоптоза во всех тканях организма. Белок p53 активируется при повреждениях ДНК и старении клетки. Функция p53 состоит в удалении из пула реплицирующихся клеток тех клеток, которые являются потенциально онкогенными. В быстро делящихся клетках было обнаружено увеличение концентрации белка p53 по сравнению с медленно пролиферирующими клетками. Увеличение концентрации p53 в данном случае свидетельствует о том, что клетки, которые быстро реплицируют ДНК, более подвержены возникновению повреждений генетического аппарата, чем неделящиеся клетки в фазе G0. Активированный белок p53 является специфическим транскрипционным фактором. Гены, транскрипцию которых стимулирует белок p53, кодируют белки-компоненты апоптотической программы (каспазы) и белки, регулирующие клеточный цикл. Существуют различные биорегуляторы пептидной природы, способствующие ингибировать апоптоз.

Виментин – белок промежуточных филаментов соединительных тканей и других тканей мезодермального происхождения. Промежуточные филаменты наряду с микротрубочками и актином участвуют в построении цитоскелета. Виментин играет значительную роль в закреплении органелл и поддержании их положения в цитоплазме. Несмотря на то что большинство промежуточных филаментов – это устойчивые структуры, в фибробластах содержащие виментин филаменты являются динамической структурой. Динамическая природа виментина важна для изменения формы клеток. Именно виментин обеспечивает прочность клеток и их устойчивость к механическому стрессу. Поэтому считается, что виментин – компонент цитоскелета, отвечающий за поддержание целостности клетки. Показано, что клетки, лишенные виментина, крайне чувствительны к механическим повреждениям. Виментин используется как маркер мезодермальных тканей.

Серотонин (5-гидрокситриптамин) – один из основных нейромедиаторов. По химическому строению серотонин относится к биогенным аминам, классу триптаминов. Серотонин образуется из аминокислоты триптофана путем ее последовательного 5-гидроксилирования ферментом 5-триптофангидроксилазой, в результате чего получается 5-гидрокситриптофан, и затем декарбоксилирования получившегося гидрокситриптофана ферментом триптофандекарбоксилазой. 5-триптофангидроксилаза синтезируется

только в some серотонинергических нейронах, гидроксирование происходит в присутствии ионов железа и кофактора птеридина. Из серотонина синтезируется N-ацетилсеротонин (NAS) – предшественник мелатонина, который обладает выраженным геропротекторным действием на клетки головного мозга, в несколько раз более сильным, чем у мелатонина. NAS регулирует когнитивные функции головного мозга, оказывает антидепрессантное и антигипертензивное действие, увеличивает продолжительность жизни и нивелирует влияние бета-амилоидных токсинов на нейроны.

Гибель серотониновых нейронов и нейротрансмиттеров при нормальном старении и нейропсихиатрических заболеваниях позднего периода жизни может способствовать изменениям поведения, обычно наблюдаемым в старшей возрастной группе пациентов. Исчерпывающее доказательство заключается в возникновении дефицита серотонинергической нейротрансмиссии при развитии основной депрессии. При болезни Альцгеймера концентрации серотонина снижены на 18% в передней коре и на 21–37% в гиппокампе и полосатом теле. В дальнейшем возникло предположение, что связанные с возрастом изменения серотонинергических нейронов могут свидетельствовать о предрасположенности к депрессии. Обнаружено также, что нарушения серотонинергической функции могут приводить к ухудшению умственных способностей при болезни Альцгеймера. В литературе описаны данные, свидетельствующие о существенной потере допамина иммунопозитивными нейронами в мозге при болезни Паркинсона. У пациентов с болезнью Альцгеймера также было отмечено снижение концентраций допамина (на 18–27% по сравнению с нормальным уровнем) в височной области коры и гиппокампе. На различных участках головного мозга неврологически нормальных пожилых людей и пациентов с болезнью Альцгеймера той же возрастной группы с помощью иммуноцитохимического метода было проведено сопоставление соотношения нейронов, экспрессирующих катехоламины (КА).

Кальмодулин – небольшой, кислый, высококонсервативный кальций-связывающий белок, представитель суперсемейства белков EF-hand. Кальмодулин обнаружен в цитоплазме всех эукариотических клеток, что отличает его от других кальций-связывающих белков. Кальмодулин был впервые выделен из мозга быка и секвенирован в 1980 году. Молекула белка состоит из двух глобулярных долей (доменов), разделенных центральным спиральным шарниром. Каждая глобулярная доля имеет по два Ca^{2+} -связывающих сайта, содержащих мотив спираль–петля–спираль (EF-hand). Белок состоит из 148 аминокислотных остатков и имеет молеку-

лярный вес около 16 700 Да. Сам кальмодулин не проявляет ферментативной активности, но является интегральной субъединицей целого ряда ферментов (протеинкиназы, протеинфосфатазы, фосфодиэстеразы, ферменты мышечной подвижности). Он связывает и активирует более 40 мишеней. Такое разнообразие функций и, одновременно, специфичность действия кальмодулина пока не находят объяснения. Концентрация кальмодулина в клетке варьирует в пределах 5–10 мкМ и составляет около половины концентрации всех Ca²⁺-связывающих белков.

1.2. Методология исследования влияния пептида EDR на экспрессию сигнальных молекул в культурах нейронов головного мозга

Объектом для морфофункционального исследования была выбрана кора головного мозга молодых (3 мес.) и старых (24 мес.) крыс линии Wistar. Культуры клеток, полученные от молодых животных, далее по тексту названы «молодыми» культурами, а клетки, полученные от старых крыс, – «старыми» культурами.

Для исследования влияния пептидов на кору головного мозга использовали диссоциированные культуры (табл. 1.1).

Тканевые и клеточные культуры давно нашли применение для решения различных вопросов биологии и медицины. Использование культур клеток для решения целого ряда актуальных задач, стоящих перед медициной и биологией, основано на сохранении

Таблица 1.1

Схема проведения экспериментов по изучению нейропротекторных свойств пептидов в культурах клеток коры головного мозга

Диссоциированная первичная культура	От молодых крыс («молодая» культура) От старых крыс («старая» культура)
Группы	1 группа – контроль 2 группа – добавление пептида KED 3 группа – добавление пептида EDR 4 группа – добавление кортексина
Концентрация пептидов	KED – 20 нг/мл EDR – 20 нг/мл Кортексин – 100 нг/мл
Иммуноцитохимические маркеры	p53, виментин, кальмодулин, серотонин

жизнеспособности клеток, выделенных из живого организма, возможности выращивать клетки вне организма.

Одно из преимуществ клеточной культуры перед другими объектами исследования – это возможность продолжительного наблюдения за жизнедеятельностью клеток, за состоянием отдельных клеточных органелл, процессами, протекающими в клетках, а также фиксации состояния культуры с учетом количественных и качественных параметров.

Материалом для выделения первичной культуры клеток служила кора головного мозга, полученная от молодых крыс линии Wistar. Для иммуноцитохимического исследования использовали следующие первичные моноклональные антитела (1:50, Dako): p53, серотонин, кальмодулин, виментин.

Для оценки результатов иммуноцитохимического окрашивания диссоциированных культур клеток коры головного мозга проводили морфометрическое исследование с использованием системы компьютерного анализа.

Площадь экспрессии рассчитывали как отношение площади, занимаемой иммунопозитивными клетками, к общей площади клеток в поле зрения и выражали в процентах. Площадь экспрессии характеризует количество клеток, в которых экспрессируется исследуемый маркер. Оптическая плотность отражает количество рецепторов на одной клетке.

Статистическая обработка экспериментальных данных включала в себя подсчет среднего арифметического и стандартного отклонения для каждой выборки и проводилась в программе Matlab R2012a.

Для анализа вида распределения использовали критерий Шапиро–Уилка (Shapiro–Wilk's W-test). Для проверки статистической однородности нескольких выборок были использованы непараметрические процедуры однофакторного дисперсионного анализа (критерий Крускала–Уоллиса).

В случаях, когда дисперсионный анализ выявлял статистически значимую неоднородность нескольких выборок, для последующего выявления неоднородных групп (путем их попарных сравнений) применяли процедуры множественных сравнений с помощью U-критерия Манна–Уитни.

Критический уровень достоверности нулевой гипотезы (об отсутствии различий) принимали равным 0,05.

1.3. Влияние пептида EDR на экспрессию сигнальных молекул в культурах нейронов головного мозга

1.3.1. Влияние пептида EDR на экспрессию апоптотического белка р53 в культурах нейронов головного мозга

При старении культуры экспрессия р53 увеличивалась в 1,4 раза по сравнению с «молодыми» культурами клеток. Так, в «молодых» культурах экспрессия белка р53 составила $1,21 \pm 0,06\%$, а в «старых» культурах $1,70 \pm 0,09\%$.

Экспрессия проапоптотического протеина р53 представлена на рис. 1.1.

При введении пептида EDR в «молодые» культуры клеток экспрессия маркера р53 достоверно снижалась на 10% (с $1,21 \pm 0,06\%$ до $1,1 \pm 0,05\%$) по сравнению с контролем, а при введении в «старые» культуры — уменьшалась на 17% (с $1,7 \pm 0,09\%$ до $1,5 \pm 0,08\%$). Кортексин достоверно подействовал только на «старые» культуры клеток и снизил экспрессию белка р53 на 11% (с $1,7 \pm 0,09\%$ до $1,5 \pm 0,08\%$). При введении пептида KED статистически достоверных изменений в экспрессии белка р53 не наблюдалось (см. рис. 1.1).

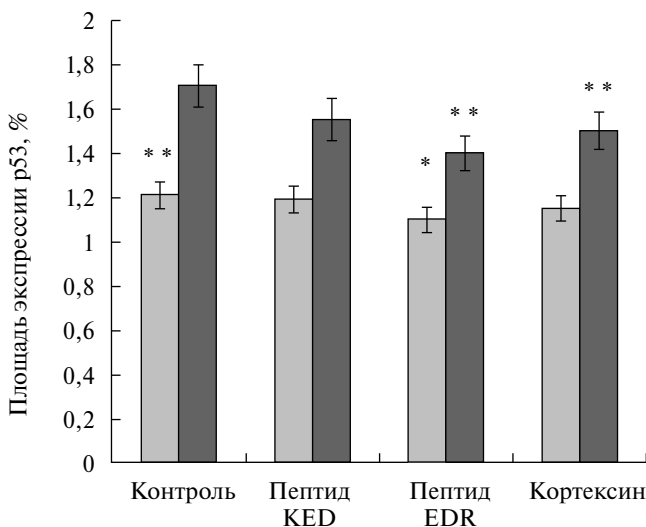


Рис. 1.1. Оценка действия пептидов KED, EDR и кортексина на синтез протеина р53 по площади его экспрессии в диссоциированных культурах клеток коры головного мозга крыс: * — $p < 0,05$ по сравнению с контролем; ** — $p < 0,05$ по сравнению с контрольной группой в «старых» культурах клеток. Светлые столбики — «молодые» культуры, темные — «старые» культуры

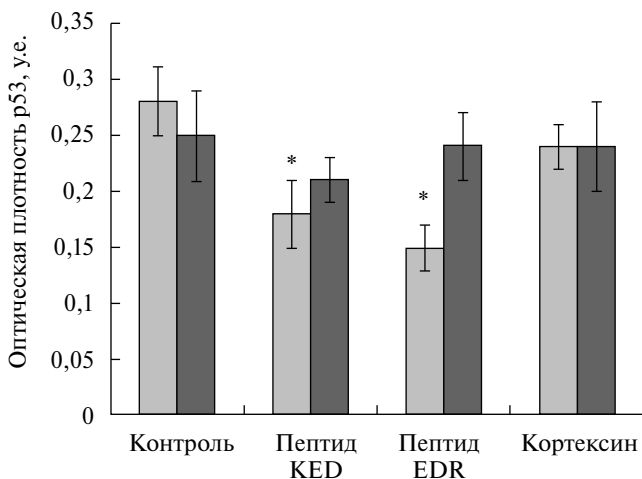


Рис. 1.2. Оценка действия пептидов KED, EDR и кортиксина на синтез белка р53 по оптической плотности его экспрессии в диссоциированных культурах клеток коры головного мозга: * – $p < 0,05$ по сравнению с контролем. Пояснения к рис. 1.2–1.8 см. на рис. 1.1

По показателю оптической плотности статистически достоверные различия в экспрессии р53 были выявлены только при введении пептидов KED и EDR в «молодые» культуры клеток (рис. 1.2). При введении пептида KED оптическая плотность снизилась на 35% (с $0,28 \pm 0,03\%$ до $0,18 \pm 0,03\%$), а при введении пептида EDR – на 53% (с $0,28 \pm 0,03\%$ до $0,15 \pm 0,02\%$). При введении кортиксина достоверных изменений в оптической плотности р53 не наблюдалось.

1.3.2. Влияние пептида EDR на экспрессию виментина в культурах нейронов головного мозга

При старении культур клеток экспрессия виментина не изменялась. В «молодых» и «старых» культурах клеток при добавлении пептидов кортиксина, KED и EDR достоверного изменения площади и оптической плотности экспрессии виментина не обнаружено. Площадь экспрессии белка виментина в диссоциированных культурах клеток коры головного мозга крысы представлена на рис. 1.3 и 1.4.

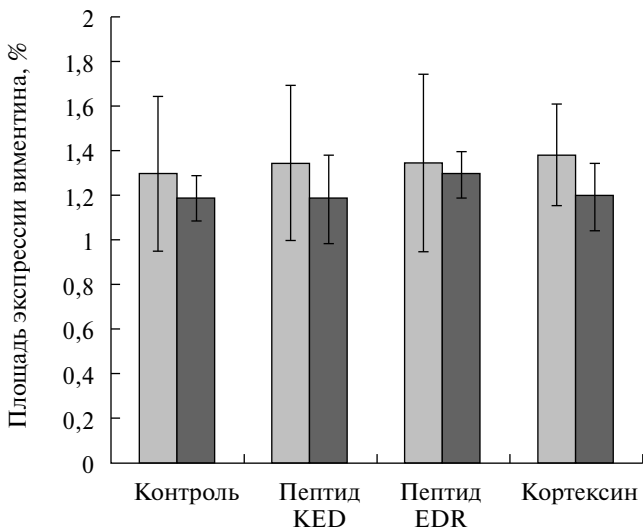


Рис. 1.3. Влияние пептидов KED, EDR и кортиксина на синтез виментина по площади его экспрессии в диссоциированных культурах клеток коры головного мозга

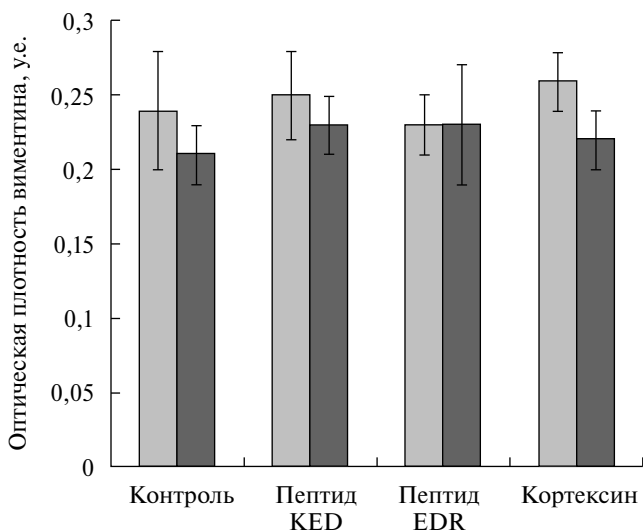


Рис. 1.4. Влияние пептидов KED, EDR и кортиксина на синтез виментина по оптической плотности его экспрессии в диссоциированных культурах клеток коры головного мозга

1.3.3. Влияние пептида EDR на экспрессию серотонина в культурах нейронов головного мозга

При старении культур клеток достоверного снижения площади экспрессии маркера серотонина не установлено, однако тенденция к ее снижению наблюдалась. При добавлении пептидов KED, EDR и кортексина в «молодые» культуры клеток коры головного мозга крысы наблюдалось достоверное увеличение площади экспрессии маркера серотонина соответственно в 1,8; 2,4 и 2,2 раза (рис. 1.5). При добавлении пептида EDR в «старые» культуры клеток площадь экспрессии серотонина увеличивалась в 1,2 раза. Однако при добавлении пептида KED и кортексина в «старые» культуры клеток статистически значимых изменений площади экспрессии серотонина не наблюдалось.

На рисунке 1.6 представлена гистограмма оптической плотности экспрессии серотонина в культурах клеток коры головного мозга крыс. По показателю оптической плотности экспрессии серотонина статистически достоверных различий в «молодых» и «старых» культурах клеток не выявлено. При добавлении пеп-

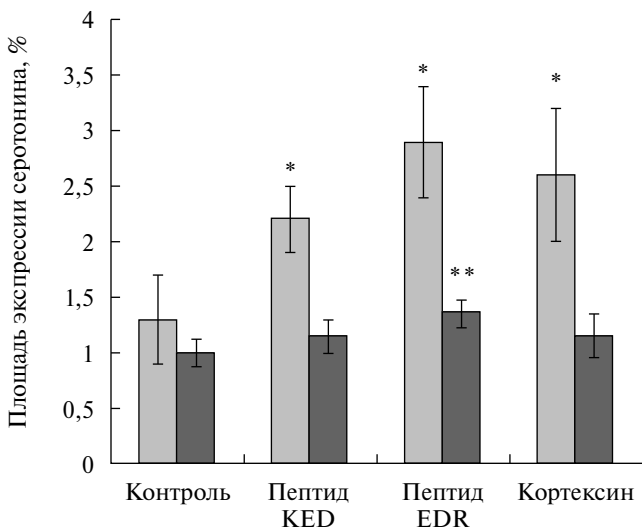


Рис. 1.5. Действие пептидов KED, EDR и кортексина на синтез серотонина по площади его экспрессии в диссоциированных культурах клеток коры головного мозга: * $p < 0,05$ по сравнению с контрольной группой в «молодых» культурах клеток; ** – $p < 0,05$ по сравнению с контрольной группой в «старых» культурах клеток

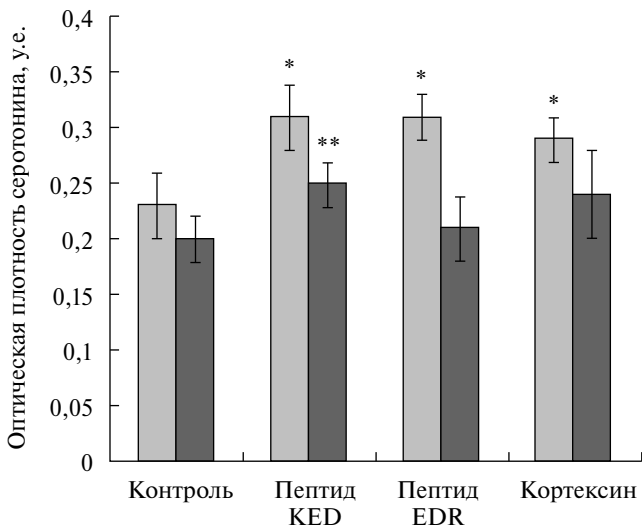


Рис. 1.6. Действие пептидов KED, EDR и кортексина на синтез серотонина по оптической плотности его экспрессии в диссоциированных культурах клеток коры головного мозга крыс: * $p < 0,05$ по сравнению с контрольной группой в «молодых» культурах клеток; ** – $p < 0,05$ по сравнению с контрольной группой в «старых» культурах клеток

тидов KED, EDR и кортексина наблюдалось увеличение оптической плотности серотонина в «молодых» культурах соответственно в 1,3; 1,3; 1,2 раза по сравнению с контрольной группой. В «старых» культурах клеток при введении пептида KED оптическая плотность увеличивалась в 1,2 раза. Введение пептида EDR и кортексина не вызывало статистически значимых изменений оптической плотности серотонина.

1.3.4. Влияние пептида EDR на экспрессию кальмодулина в культурах нейронов головного мозга

При старении клеток экспрессия кальмодулина не изменялась. В «молодых» и «старых» культурах клеток при добавлении пептидов KED, EDR и кортексина достоверного изменения площади экспрессии кальмодулина не обнаружено (рис. 1.7). Оптическая плотность экспрессии кальмодулина достоверно не изменялась при введении пептидов (рис. 1.8).

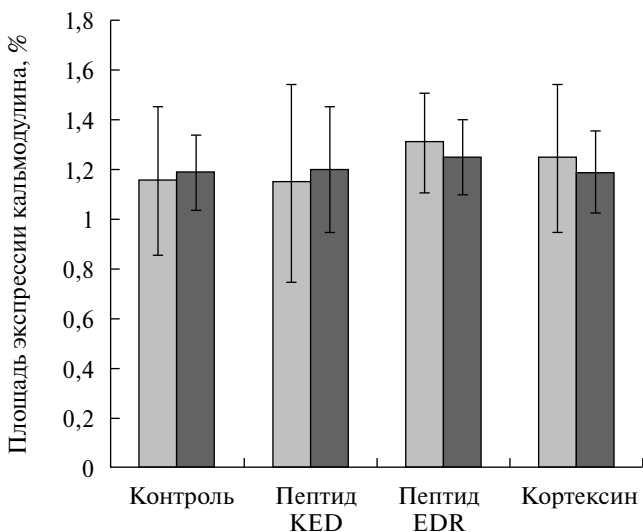


Рис. 1.7. Оценка действия пептидов KED, EDR и кортексина на синтез кальмодулина по площади его экспрессии в диссоциированных культурах клеток коры головного мозга

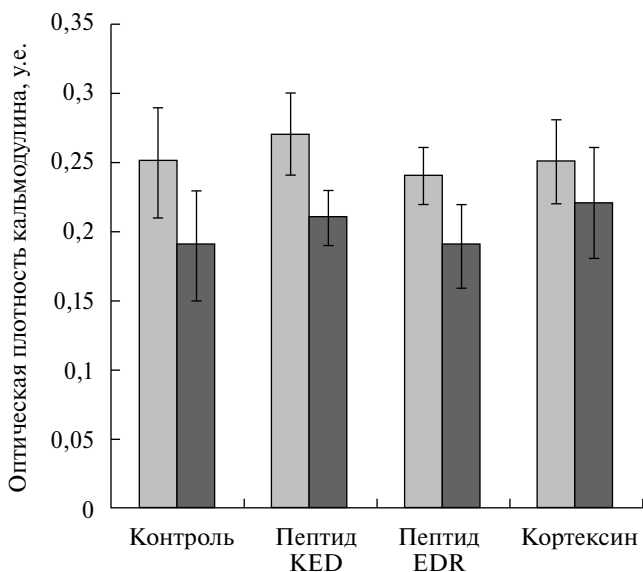


Рис. 1.8. Оценка действия пептидов KED, EDR и кортексина на синтез кальмодулина по оптической плотности его экспрессии в диссоциированных культурах клеток коры головного мозга

Заключение

Ранее было установлено, что пептиды KED и EDR обладают вазопротекторным и нейропротекторным действием соответственно. Кроме того, показано, что применение кортексина и пептида EDR у людей пожилого возраста приводило к улучшению психоэмоционального состояния, нейрофизиологического состояния ЦНС и памяти. Однако молекулярные механизмы и сравнительная биологическая активность этих пептидов изучены лишь частично. Так, предполагается, что кортексин регулирует активность нескольких генов, кодирующих нейропротекторные белки, а пептид EDR связывается CG- и CNG-последовательностями в ДНК и повышает активность антиоксидантной системы.

В данном исследовании приводятся новые аспекты молекулярных механизмов действия нейропротекторного пептида EDR, кортексина и вазопротекторного пептида KED в отношении клеток коры головного мозга крыс.

Установлено, что в диссоциированных культурах клеток коры головного мозга короткие пептиды KED и EDR снижали уровень апоптоза, оцениваемого по экспрессии белка p53. При этом кортексин не обладал таким действием. Крайне важным является результат, свидетельствующий о повышении синтеза серотонина в культурах клеток коры головного мозга животных под действием кортексина и пептидов KED и EDR. Известно, что из серотонина синтезируется N-ацетилсеротонин (NAS) – предшественник мелатонина, который обладает выраженным геропротекторным действием на клетки головного мозга. NAS регулирует когнитивные функции головного мозга, оказывает антидепрессантное и антигипертензивное действие, увеличивает продолжительность жизни и нивелирует влияние бета-амилоидных токсинов на нейроны. Возможно, именно повышение синтеза серотонина, и, следовательно, стимуляция выработки NAS, является одним из механизмов нейропротекторного действия изученных пептидных биорегуляторов.

Литература

1. Гранстрем О.К., Сорокина Е.Г., Сторожевых Т.П. и др. Последние новости о кортексине // Terra Medica. 2008. № 5. С. 40–44.
2. Демьяненко С.В., Ивошина К.О., Карантыш Г.В. и др. Эффекты кортексина и пинеалона на выживаемость, поведение и активность каспазы-3 старых крыс в модели окклюзии сонных артерий // Валеология. 2010. № 2. С. 26–32.

3. Козина Л.С., Арутюнян А.В., Стволинский С.Л., Хавинсон В.Х. Оценка биологической активности регуляторных пептидов в модельных экспериментах *in vitro* // Успехи геронтологии. 2008. Т. 21, № 1. С. 68–73.
4. Пальцев М.А., Кветной И.М., Полякова В.О. и др. Нейроиммуноэндокринные механизмы старения и возрастной патологии. СПб.: Наука, 2012. 463 с.
5. Петрова Е.С. Виментин и глиальный фибриллярный кислый белок в клетках эктопических нейротрансплантатов неокортекса крыс // Морфология. 2011. Т. 139, № 2. С. 22–26.
6. Рыжак Г.А., Малинин В.В., Платонова Т.Н. Кортексин и регуляция функций головного мозга. СПб.: ИКФ «Фолиант», 2003. 208 с.
7. Умнов Р.С., Линькова Н.С., Хавинсон В.Х. Нейропротекторные эффекты пептидных биорегуляторов у людей разного возраста: обзор литературы // Успехи геронтологии. 2013. Т. 26, № 4. С. 671–678.
8. Умнов Р.С., Линькова Н.С., Хавинсон В.Х. Пептиды стимулируют экспрессию сигнальных молекул в культурах клеток нейронов животных разного возраста // Клеточные технологии в биологии и медицине. 2014. № 2. С. 123–126.
9. Хавинсон В.Х., Линькова Н.С., Тарновская С.И. и др. Короткие пептиды стимулируют экспрессию серотонина в клетках коры головного мозга // Бюл. эксп. биол. и мед. 2014. Т. 157, № 1. С. 89–93.
10. Хавинсон В.Х., Кветной И.М. Пептидные биорегуляторы ингибируют апоптоз // Бюл. эксп. биол. и мед. 2000. Т. 130, № 12. С. 657–659.
11. Хавинсон В.Х., Анисимов В.Н. Пептидные биорегуляторы и старение. СПб.: Наука, 2003. 232 с.
12. Хавинсон В.Х., Линькова Н.С., Трофимов А.В. и др. Морфофункциональные основы пептидной регуляции старения // Успехи современной биологии. 2011. Т. 131, № 2. С. 115–121.
13. Хавинсон В.Х., Федорева Л.И., Ванюшин Б.Ф. Короткие пептиды модулируют действие эндонуклеаз из проростков пшеницы // ДАН. 2011. Т. 437, № 1. С. 124–127.
14. Хавинсон В.Х., Соловьёв А.Ю., Жилинский Д.В. и др. Эпигенетические аспекты пептидной регуляции старения // Успехи геронтологии. 2012. Т. 25, № 1. С. 11–22.
15. Anisimov V.N., Khavinson V.Kh. Peptide bioregulation of aging: results and prospects // Biogerontology. 2010. N 11. P. 139–149.
16. Cavallo F., Feldman D.R., Barchi M. Revisiting DNA damage repair, p53-mediated apoptosis and cisplatin sensitivity in germ cell tumors // Int. J. Dev. Biol. 2013. Vol. 57, N (2-3-4). P. 273–280.
17. Fedoreeva L.I., Kireev I.I., Khavinson V.Kh., Vanyushin B.F. Penetration of short fluorescence-labeled peptides into the nucleus in heLa cells and *in vitro* specific interaction of the peptides with deoxyribooligonucleotides and DNA // Biochemistry. 2011. Vol. 76, N 11. P. 1210–1219.
18. Fujimoto H., Woo G.H., Inoue K. et al. Increased cellular distribution of vimentin and Ret in the cingulum induced by developmental hypothyroidism in rat offspring maternally exposed to anti-thyroid agents // Reprod Toxicol. 2012. Vol. 34, N 1. P. 93–100.
19. Khavinson V.Kh., Malinin V.V. Gerontological aspects of genome peptide regulation. Basel (Switzerland): Karger AG, 2005. 104 p.
20. Khavinson V.Kh., Fedoreeva L.I., Vanyushin B.F. Short peptides modulate the effect of endonucleases of wheat seedling // Doklady Biochemistry and Biophysics. 2011. Vol. 437. P. 64–67.

21. *Matsumoto A., Susaki E., Onoyama I.* et al. Deregulation of the p57-E2F1-p53 axis results in nonobstructive hydrocephalus and cerebellar malformation in mice // *Mol. Cell Biol.* 2011. Vol. 31, N 20. P. 4176–4192.
22. *Roghianian A., Jones D.C., Pattisapu J.V.* et al. Filament-associated TSGA10 protein is expressed in professional antigen presenting cells and interacts with vimentin // *Cell Immunol.* 2010. Vol. 265, N 2. P. 120–126.
23. *Russo L.C., Asega A.F., Castro L.M.* et al. Natural intracellular peptides can modulate the interactions of mouse brain proteins and thimet oligopeptidase with 14-3-3 ϵ and calmodulin // *Proteomics.* 2012. Vol. 12, N 17. P. 2641–2655.
24. *Saha M.N., Qiu L., Chang H.* Targeting p53 by small molecules in hematological malignancies // *J. Hematol. Oncol.* 2013. Vol. 6, N 23. P. 1–9.
25. *Shahbazi J., Lock R., Liu T.* Tumor protein 53-induced nuclear protein 1 enhances p53 function and represses tumorigenesis // *Front Genet.* 2013. Vol. 4. P. 1–7.
26. *Yoshida N., Maejima Y., Sedbazar U.* et al. Stressor-responsive central nesfatin-1 activates corticotropin-releasing hormone, noradrenaline and serotonin neurons and evokes hypothalamic-pituitary-adrenal axis // *Aging (Albany NY).* 2010. Vol. 2, N 11. P. 775–784.

Глава 2

Клеточные аспекты нейропротекторного действия пептида EDR в моделях нейродегенеративных заболеваний *in vitro*

2.1. Нейродегенеративные заболевания как возрастная патология

Нейродегенеративные заболевания (НДЗ) – заболевания нервной системы, которые характеризуются прогрессирующей гибелью нейронов мозга. К наиболее распространенным и тяжелым НДЗ относятся следующие болезни: Альцгеймера (БА), Паркинсона, Хантингтона (БХ) и боковой амиотрофический склероз (БАС). В настоящее время во всем мире насчитывается более 45 миллионов людей, преимущественно пожилого возраста, страдающих НДЗ. Поскольку в развитых странах мира наблюдается старение населения, частота встречаемости НДЗ имеет тенденцию к увеличению. У людей старше 70 лет распространенность НДЗ составляет около 5%, а среди лиц старше 80 лет – 10–15%. Число пациентов с БА в мире превышает 30 миллионов. НДЗ затрагивают не только когнитивные, но и двигательные функции, что указывает на их высокую социальную значимость.

НДЗ проявляются в виде множественных когнитивных и/или двигательных нарушений и приводят к инвалидизации, а затем к смерти больного. При БА смерть наступает в среднем через 8 лет, а при БАС – через 5 лет после постановки диагноза. Патогенетическими факторами гибели нейронов при НДЗ являются: накопление токсических белковых агрегатов, окислительный стресс, митохондриальная дисфункция, внутриклеточный кальциевый дисбаланс.

В последнее время появились данные о том, что в патогенезе НДЗ важную роль играет дисфункция возбудимых клеток периферических органов, относящихся к нервно-мышечной и сердечно-сосудистой системам. Патология нервно-мышечной и сердечно-

сосудистой систем при НДЗ не является только «отражением» дегенеративных изменений в нервной системе, а представляет собой отдельный аспект патогенеза НДЗ.

В настоящее время не существует эффективных и безопасных средств лечения НДЗ. Большинство применяемых препаратов действует симптоматически. НДЗ обычно диагностируются на этапе декомпенсации, когда наблюдается выраженная гибель нейронов головного мозга и терапия затруднена.

2.2. Молекулярные аспекты болезни Альцгеймера и Хантингтона

2.2.1. Болезнь Альцгеймера

Болезнь Альцгеймера (БА) – прогрессирующее нейродегенеративное заболевание, наиболее распространенная форма деменции. Основные признаки БА – прогрессирующее расстройство памяти, формирование сенильных бляшек и нейрофибриллярных клубков в головном мозге, активация микроглии, атрофия мозга, сопровождающаяся уменьшением средних височных долей, гиппокампа, теменной доли, некоторых участков фронтальной коры и поясной извилины.

В настоящее время существует множество гипотез, которые пытаются объяснить молекулярные механизмы патогенеза БА, однако ни одна из них не является подтвержденной. К основным теориям патогенеза БА относятся: амилоидная, связанная с τ -протеином, кальциевая, иммунологическая и гипотеза, связанная с дисфункцией микроглии. Важное значение для понимания модели БА, используемой в исследовании, имеют классические гипотезы возникновения БА, связанные с β -амилоидом ($A\beta$) и τ -протеином.

$A\beta$ является продуктом фрагментации белка-предшественника (APP) – трансмембранного белка I типа (рис. 2.1 и 2.2), внеклеточный N-концевой домен которого (sAPP) может быть отделен в ходе двух независимых путей протеолиза. Ферменты, задействованные в процессе отщепления $A\beta$, носят название секретаз. В ходе реализации более распространенного пути протеолиза APP сначала подвергается воздействию α -секретазы – одного или нескольких представителей семейства белков ADAM (a disintegrin and metalloproteinase domain). Преобладающей формой α -секретазы в мозге является ADAM10, причем недавно две редкие мутации ADAM10 были идентифицированы как фактор, predisposing

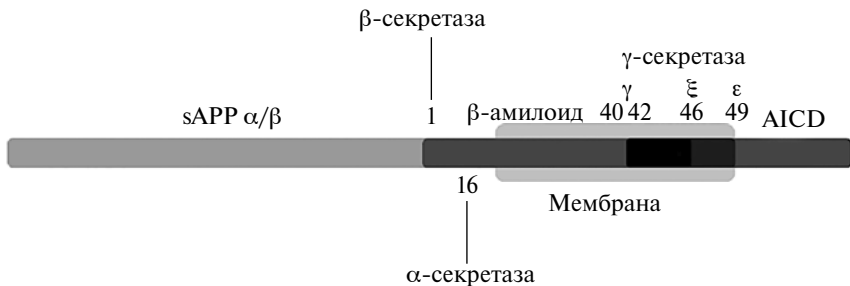


Рис. 2.1. Схематическое изображение полноразмерного APP с указанием расположения трансмембранного домена (выделено овалом) и сайты расщепления α-, β- и γ-секретазы, которые соответственно приводят к образованию: растворимого sAPPα и APP-CTFα; растворимого sAPPβ и APP-CTFβ; Aβ внутриклеточного домена амилоида (AICD)

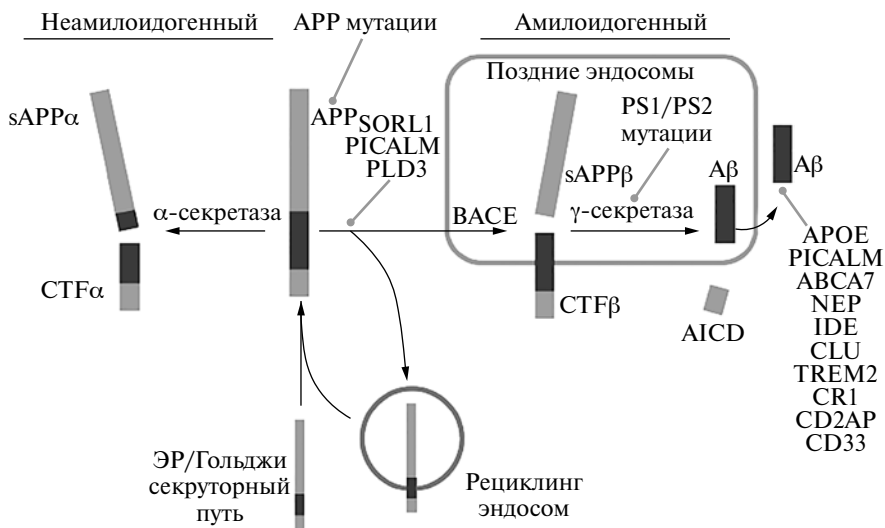


Рис. 2.2. Схематическое изображение путей процессинга APP — неамилоидогенного (с участием α-секретазы и возвращением эндосом к цитоплазматической мембране) и амилоидогенного (нарезание β-секретазой и γ-секретазой) [Bohm C. et al., 2015]

ющий к ранней форме БА. Однако это открытие еще нуждается в подтверждении.

Путь протеолиза, в котором задействована α-секретазы, называют неамилоидогенным, поскольку происходит фрагментация молекулы APP вблизи внешней поверхности мембраны нейрона между аминокислотными остатками внутри последовательности Aβ, что предотвращает последующее образование молекулы ами-

лоидного пептида. Альтернативная более редкая реакция расщепления катализируется β -секретазой (BACE), которая производит разрыв APP вблизи N-конца соответствующего домена A β , расположенного рядом с внешней стороной мембраны нейрона, на расстоянии 16 аминокислотных остатков от места расщепления α -секретазой (см. рис. 2.1). APP и β -секретеза попадают в клетку по независимым путям эндоцитоза и встречаются в клатриновых везикулах или в ранних эндосомах, где происходит расщепление APP β -секретазой с участием белков PICALM, BIN1 и CD2AP. После эндоцитоза APP направляется в различные компартменты внутри клетки благодаря работе внутриклеточных рецепторов везикулярного транспорта. Взаимодействия с данными рецепторами и белком SORL1 определяют, будет ли полноразмерный APP перенаправлен к ретромерному комплексу или продолжит путь к зрелым эндосомам. Ретромерный комплекс – консервативный белковый комплекс, который собирается на эндосомах и возвращает в комплекс Гольджи ряд физиологически важных белков, включая SORL1. Связанный с мембраной C-концевой фрагмент (CTF) APP, возникший в результате действия α - либо β -секретазы, подвергается вторичному внутримембранному эндопротеолизу γ -секретазой. В комплексе с γ -секретазой функционируют пресенилины 1 и 2, никастрин, aph-1 и rep-2. Продукты гидролиза APP-CTF γ -секретазой далее освобождаются из плазматической мембраны во внутриклеточное и во внеклеточное пространство (см. рис. 2.2).

После выделения A β из мозга пациентов с БА и частичного установления его первичной структуры Джордж Гленнер предложил гипотезу, согласно которой БА может возникать в результате накопления неправильно свернутых β -структурных белков. В настоящее время эта гипотеза получила широкое распространение. Однако накопления A β недостаточно для развития БА. Для этого необходимо повышение содержания в головном мозге τ -протеина.

Исследования последних лет выявили многочисленные функциональные взаимодействия между A β и τ -протеином. Более того, характер распространения токсичного, подвергшегося неправильному фолдингу A β и τ -протеина, имеет черты значительного сходства с распространением неправильно свернутых форм конститутивного прионного белка PrP^{Sc}. Помимо этого, неправильно свернутый A β вызывает нарушение фолдинга τ -протеина *in vitro*. Предполагается, что A β в патологической конформации служит матрицей, приводящей к неправильному фолдингу τ -протеина *in vivo*. Как уже указывалось, БА – медленно прогрессирующее нейродегенеративное заболевание, характеризующееся непра-

вильным сворачиванием, агрегацией и проявлением токсичности Аβ и τ-протеина в тканях мозга. Агрегированный Аβ в виде плотно упакованных фибрилл откладывается внеклеточно, образуя амилоидные бляшки (сенильные бляшки). τ-протеин, агрегируя, также образует плотно упакованные филаменты, но, в отличие от амилоидных бляшек, они накапливаются внутриклеточно в пораженных нейронах, формируя нейрофибрилярный клубок (NFT). Термин РНФ («парный спиральный филамент») нередко используется для обозначения отдельных филаментов τ-протеина в составе NFT. За последнее десятилетие утвердились представления о том, что центральное место в патогенезе БА занимают растворимые олигомерные формы Аβ. В сравнении с фибриллярной формой, содержание растворимых олигомеров Аβ лучше коррелирует с проявляемой *in vivo* нейротоксичностью.

2.2.2. Болезнь Хантингтона

Болезнь Хантингтона (БХ) — одно из тяжелых прогрессирующих наследственных нейродегенеративных заболеваний, распространенность которого среди населения составляет примерно 1:10 000. Джордж Хантингтон (George Huntington) впервые описал данное заболевание в 1872 г. При этой патологии больной выполняет непроизвольные, нескоординированные быстрые движения, которые похожи на танцующую походку, врачи в настоящее время так описывают моторные нарушения, которые характерны для заболевания. Первые симптомы, характерные для БХ, проявляются в среднем возрасте. Болезнь может длиться до двадцати лет, в итоге больной теряет способность самостоятельно передвигаться, говорить и оценивать окружающую действительность адекватно. Обычно симптомы БХ проявляются в возрасте от 30 до 50 лет, хотя у 5–10% пациентов отмечается появление симптомов в возрасте до 20 лет — ювенильная форма заболевания.

Начало заболевания у пациентов с БХ, как правило, характеризуется быстрыми, непроизвольными, нерегулируемыми движениями, которые возникают в различных мышечных группах. У больных среди ранних симптомов наблюдаются психические расстройства, такие как нервозность и депрессия. Классическая клиническая триада, характерная для БХ, включает генерализованный хореический гиперкинез, деменцию подкоркового типа и поведенческие расстройства. Отличительной чертой БХ являются когнитивные нарушения: нарушаются память и интеллект, способность к принятию решений, появляется дезориентация. Прогрес-

сирующее развитие симптомов через 15–25 лет после проявления первых симптомов приводит к смерти пациента.

На ранних стадиях БХ поражается преимущественно стриатум, включающий в себя хвостатое ядро и скорлупу, и именно в нем проявляются первые патологические нарушения. На поздних стадиях дегенеративные процессы распространяются на другие области головного мозга: таламус, мозжечок, черную субстанцию и бледный шар. Дальнейшая гибель нейронов приводит к атрофии всего головного мозга. При БХ больше всего подвержены гибели ГАМК-ергические средние шпиковые нейроны (СШН) хвостатого ядра и скорлупы. При БХ в базальных ядрах происходит снижение концентрации ГАМК и глутаматдекарбоксилазы – фермента, который участвует в синтезе этого медиатора, уменьшаются концентрации вещества Р и энкефалинов. Посредством магнитно-резонансной спектроскопии было выявлено увеличение концентрации лактата в базальных ядрах.

В настоящее время БХ относят к группе заболеваний глутаминовой экспансии (поли-Q заболевания). При БХ происходит увеличение количества повторов триплета СAG (цитозин-аденин-гуанин), кодирующего глутамин, в первом экзоне гена белка хантинтина (Htt). Данная последовательность называется полиглутаминовым трактом. Ген НТТ расположен на коротком плече четвертой хромосомы и состоит из 67 экзонов общей длиной 200 тысяч пар нуклеотидов. Последовательность гена высоко консервативна. Согласно базе данных Homolo Gene, гомология гена хантинтина человека с его ортологом у мыши составляет около 86%, у курицы – 75%, у рыбы *Danio rerio* – 70%. Гомолог Htt найден у *Drosophila melanogaster*. Особенностью мутации гена НТТ является корреляция между возрастом появления первых симптомов БХ и количеством повторов триплета СAG. В норме у человека длина повторов варьирует от 10 до 35. У пациентов с БХ количество повторов триплета составляет от 36 до 121 и от 50 и выше при ювенильной форме заболевания. Таким образом, длина СAG участка находится в обратной корреляции с моментом начала заболевания. БХ имеет неполную пенетрантность при количестве повторов 35–41 и полную – при количестве повторов более 42. На возраст появления первых симптомов влияют генетические и эпигенетические факторы. Причиной развития БХ, согласно одной из гипотез, является недостаточность, связанная с потерей функции нормального белка, а не токсичность мутантного белка (mHtt). Показано участие Htt в широком спектре биологических функций (рис. 2.3 см. на вклейке), включая скрепление белков, транспорт белков и везикул, защиту клеток от апоптоза, закрепление цитоскелета, клатрин-

опосредованный эндоцитоз, регуляцию транскрипции, постсинаптический сигналинг.

Образующиеся белковые агрегаты mHtt являются одной из характеристик развития БХ у модельных животных и у людей. Агрегаты были обнаружены в ядре, цитоплазме и в отростках нейронов. Причины того, как связана агрегация Htt с патогенезом БХ, неизвестны. Изменение нормальных функций Htt связывают с вовлечением свободного белка в агрегаты, нарушением функций убиквитин-протеасомной системы и транскрипционных факторов. Однако в ряде исследований было выявлено обратное – нарушения в работе убиквитин-протеасомной системы при БХ предшествуют накоплению агрегатов. При БХ наблюдается скопление агрегатов в интернейронах стриатума и нейронах коры, а не в СШН, которые наиболее чувствительны к БХ. Многие специалисты считают, что образование агрегатов выполняет протективную функцию, а основной патогенной формой mHtt является мономерный растворимый белок.

2.3. Дендритные шипики и синаптическая передача: роль в патогенезе нейродегенеративных заболеваний

Связь нейронов происходит через синаптическую передачу, поэтому нормальное формирование синаптических контактов на дендритном дереве – важный компонент для правильного функционирования нейронных сетей. При многих нейродегенеративных заболеваниях происходит нарушение формирования синапсов или потеря их стабильности, что ведет к разрушению нейронных сетей. Изменения морфологии дендритного дерева, количества и формы шипиков являются признаками БА, БХ и других нейродегенеративных заболеваний. Особую роль в пластичности дендритного дерева отводят шипикам – выростам небольших размеров на поверхности дендритов. Впервые шипики были описаны нейроанатомом Рамон-и-Кахалем в 1888 году, но споры об их точной функции не разрешены до сих пор. Существуют различные гипотезы о роли шипиков в синаптической передаче. Согласно одной из гипотез, считается, что шипик представляет собой структурную особенность дендритов, позволяющую им получать большее количество и разнообразие входящих сигналов. В другой гипотезе рассматривается роль шипиков в компартиментализации кальция, в третьей – шипики служат компартаментами для изоляции потенциала благодаря своей узкой шейке с высоким сопротивлением.

По мнению ряда авторов, шипики выполняют все три функции, которые служат для создания распределенной интегрированной нейронной сети.

В настоящее время принято выделять три типа шипиков: тонкие, грибовидные и пеньковые (рис. 2.4). Тонкие шипики имеют длинную, тонкую шейку и маленькую головку, в то время как у грибовидных шипиков головка намного большего размера, а пеньковые шипики не имеют шейки. Размеры дендритных шипиков в зависимости от отдела головного мозга различны у разных видов животных. Разные варианты шипиков могут находиться на одном дендрите.

Кроме названных типов шипиков на дендритах формирующихся нейронов могут быть нитеподобные выросты, называемые филоподиями, у которых, в отличие от тонких шипиков, нет головки. Предполагается, что они являются переходными структурами, которые образуют шипики в случае получения синаптического сигнала. Обычно головки шипиков образуют возбуждающие синапсы с пресинаптическими аксонами. Эти синапсы характеризуются «постсинаптической плотностью» — зоной, которая видна как электронно-плотная область на микрофотографиях. Большинство белков, которые образуют данную зону, вовлечены в синаптическую передачу и регуляцию активности синапса напрямую или через посредников. Грибовидные шипики формируют наиболее активные синапсы, и именно их присутствие является маркером высокой интегрированности нейронной сети, основой обучения и памяти. Оценка морфологии дендритного дерева и строения шипиков — важные критерии для изучения синаптической передачи.

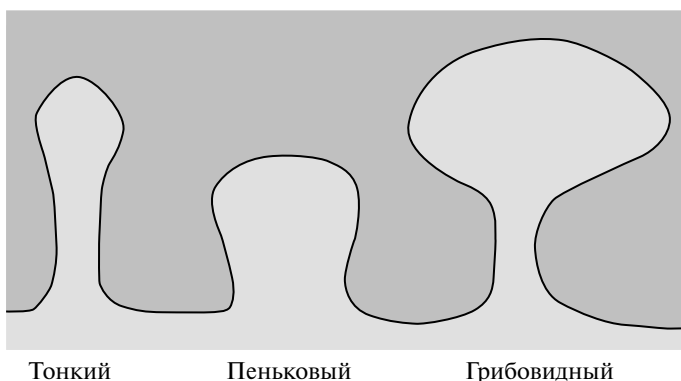


Рис. 2.4. Классификация дендритных шипиков [Hering H., Sheng M., 2001]

2.4. Методология исследования влияния пептида EDR на количество шпиков нейронов в моделях болезни Альцгеймера и Хантингтона

Объектами морфофункционального исследования для изучения нейропротекторного действия пептида EDR при БХ стали первичные диссоциированные кортико-стриатные культуры нейронов, полученные из головного мозга мышей дикого типа и трансгенных мышей с геном мутантного хантингтина человека FVB-Tg(YAC128)53Нау/J (линия YAC128; Jackson Laboratory, 004938). Объектом для морфофункционального исследования действия пептида EDR при БА были выбраны первичные диссоциированные культуры нейронов гиппокампа мышей дикого типа линии C57BL/6 (B6) (Jackson Laboratory, 000664) и мышей линии PS1-M146V-KI с мутацией M146V в гене, кодирующем белок пресенилин-1. Мыши линии PS1-M146V-KI являются моделью для изучения патогенеза БА в отсутствие токсического эффекта A β 42. У этих мышей не экспрессируется мутантный APP и соответственно не образуется токсичных форм амилоида бета. У мышей линии PS1-M146V с возрастом количество грибовидных шпиков уменьшается по сравнению с мышами дикого типа. Таким образом, выявлена корреляция между нарушением нейрональной кальциевой сигнализации и уменьшением размеров шпиков и их ликвидации. Данные модели были выбраны, так как ранее в них были успешно изучены другие нейропротекторные вещества.

На мышях линии YAC128 были изучены вещества Дантролен и Тетрабеназин. Были получены значительные улучшения в поведенческих тестах у мышей, а также значительное уменьшение потери стриатальных нейронов и образования ядерных агрегатов мутантного хантингтина. А в трансгенной мышью модели БА 3xTg-AD, содержащей мутации в генах пресенилина-1, APP и τ -протеина, такое вещество, как Вогонин, способствовало уменьшению количества амилоидных бляшек в коре и гиппокампе, а также улучшению реакции в поведенческих тестах (распознавание новых объектов и лабиринт).

Все животные были получены из вивария Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME USA). Животных содержали в условиях вивария в Лаборатории молекулярной нейродегенерации Санкт-Петербургского политехнического университета Петра Великого в соответствии с нормативами по гуманному обращению с лабораторными животными.

Пептид EDR был получен в виде стерильного раствора, разлитого в ампулы в концентрации 100 мкг/мл (разведение субстанции

пептида физиологическим раствором). Для добавления в культуры клеток пептид разводили до концентрации 20 и 200 нг/мл. Концентрации пептида для диссоциированных культур нейронов были выбраны на основании результатов ранее проведенных исследований.

Так как скрещивание двух мышей линии YAC128 ведет к летальному исходу их потомства, гетерозиготных самцов YAC128 скрещивали с самками дикого типа. Для определения генотипа их потомства (дикий тип или YAC128) был использован метод генотипирования, который включал в себя постановку полимеразной цепной реакции (ПЦР) и электрофорез продуктов ПЦР. ДНК выделяли из кончиков хвостов новорожденных мышат (0–1 сут после рождения).

Материалом для выделения первичных культур служили кора и стриатум, полученные от мышей дикого типа и трансгенных мышей YAC128 в возрасте от 0 до 2-х дней. Кортико-стриатные культуры нейронов мышей дикого типа и трансгенных мышей линии YAC128 были разделены на следующие группы:

1 группа – контроль (добавление среды для культивирования Neurobasal-A);

2 группа – добавление пептида EDR в концентрации 20 нг/мл;

3 группа – добавление пептида EDR в концентрации 200 нг/мл.

Для визуализации шипиков и дальнейшего морфофункционального анализа на 14 и 21 сутки культивирования проводили иммуноцитохимическое окрашивание кортико-стриатной культуры нейронов к маркеру СШН стриатума DARPP-32 и нейрональному маркеру MAP2. На 14 сутки культивирования нейроны достигают состояния, соответствующего нейронам в мозге взрослого человека, а на 21 сутки нейроны считаются «старыми»: в них наблюдаются клеточные процессы, характерные для мозга пожилых людей, – дисфункция сигнальных путей, снижение экспрессии киназ и фосфатаз, участвующих в фосфорилировании белков, сдвиги кальциевого гомеостаза вплоть до формирования кальцификатов в мозговой ткани и другие процессы, которые, в конечном счете, приводят к нарушению нормального функционирования нейронов. Кроме того, при старении в нейронах мышей линии YAC128 накапливается мутантный хантингтин и его агрегаты, вследствие чего нарушается функционирование нормального белка хантингтина, который выполняет широкий спектр биологических функций: скрепление белков, транспорт белков и везикул, защиту клеток от апоптоза, заякоривание цитоскелета, клатрин-опосредованный эндоцитоз, регуляцию транскрипции, постсинаптический сигналинг. Для иммуноцитохимического исследования использовали следующие первичные и вторичные антитела: anti – MAP2

mouse (разведение 1:500, Millipore, USA), anti – DARPP-32 rabbit (1:1000, Sigma, USA), AlexaFluor 488 (1:1000, Invitrogen, USA), AlexaFluor 594 (1:1000, Invitrogen, USA).

Семейство структурных фибриллярных белков, обратимо связывающихся с микротрубочками (microtubule-associated proteins, MAPs), способствуют полимеризации тубулина и необходимы для образования пучков микротрубочек. Семейство MAPs включает большое количество различных белков, из которых для изучения нервной системы наиболее часто используют белки MAP2 и Тау.

MAP2 – фосфопротеин, который локализуется в перикарионе нейрона (ассоциирован с полирибосомами), дендритах и в начальном сегменте аксона. MAP2 обеспечивает морфологическую стабильность, рост, ветвление дендритов, необходим для их посттравматического восстановления. MAP2 участвует в связывании микротрубочек друг с другом, актиновыми филаментами и нейрофиламентами. MAP2 имеет 4 изоформы, кодируемые одним геном и образующиеся путем альтернативного сплайсинга: две высокомолекулярные (280 кДа) – MAP2a, MAP2b и две низкомолекулярные (70 кДа) – MAP2c, MAP2d. Различные изоформы MAP2 являются маркером зрелости нейронов. Например, в процессе нейрональной дифференцировки в ранний постнатальный период происходит смена эмбрионального MAP2c на MAP2a. MAP2d экспрессируется в зрелых нейронах, в то время как MAP2b синтезируется на протяжении всего нейрогенеза. По мере старения организма экспрессия MAP2 снижается. В настоящее время MAP2 широко используют как специфический нейрональный маркер при изучении развития нервной системы, в исследованиях, связанных с трансплантацией и дифференцировкой стволовых клеток. Однако специфичность этого маркера может быть подвергнута сомнению, поскольку имеются данные об экспрессии MAP2c в глиальных клетках – астроцитах и олигодендроцитах, а также в некоторых клетках других тканей.

DARPP-32 – многофункциональный белок, экспрессирующийся главным образом в СШН. Предполагают, что в этих клетках DARPP-32 выполняет функцию «интегратора» нейрональной активности при действии различных нейромедиаторов, в том числе дофамина. Прямое доказательство роли дофаминовых рецепторов в регуляции фосфорилирования DARPP-32 было получено с использованием трансгенных мышей линии ВАС. Стимуляция дофаминовых рецепторов у этих мышей приводит к активации протеинкиназы-А и фосфорилированию DARPP-32 в нейронах, экспрессирующих D1-рецепторы, тогда как активация D2-рецепторов вызывает снижение уровня фосфорилирования DARPP-32 по треонину 34 вследствие угнетения активности протеинкиназы-А.

Изучение функций DARPP-32 *in vivo* и *in vitro* на срезах стриатума показало, что он активирует протеинкиназу-А. Предполагают, что этот эффект определяет способность дофаминовых рецепторов регулировать синаптическую пластичность. Так как киназы, регулирующие активность DARPP-32, могут быть активированы гормонами, нейромедиаторами, нейропептидами, DARPP-32 может координировать сигналы различной модальности. Показано, что у мышей с отсутствием белка DARPP-32 нарушены поведенческие реакции в ответ на стимуляцию дофаминовых рецепторов. В частности, это наблюдается при введении таким мышам кокаина, эффект которого связан с блокадой обратного транспорта дофамина и увеличением экстраклеточного содержания этого медиатора. Сходные результаты были получены при изучении трансгенных мышей с мутантной формой DARPP-32, лишенной треонина в 34 положении. Экспрессия белка и мРНК DARPP-32 снижена в дрозолатеральной префронтальной коре у больных шизофренией и биполярным расстройством. Экспрессия DARPP-32 также снижена в лейкоцитах больных шизофренией и биполярным расстройством, что позволило предположить генетические основы дефицита DARPP-32 при этих заболеваниях.

Для приготовления первичной диссоциированной культуры нейронов гиппокампа мышей дикого типа (линия В6) использовали новорожденных мышат (0–2 сут после рождения).

Культуру нейронов гиппокампа разделяли на следующие группы:

1 группа – контроль (добавление среды для культивирования Neurobasal-A);

2 группа – контроль + добавление синтетических олигонуклеотидов Аβ42;

3а группа – добавление Аβ42 и пептида EDR в концентрации 20 нг/мл;

3б группа – добавление Аβ42 и пептида EDR в концентрации 200 нг/мл.

На 16–17 сутки культивирования производили фиксацию клеток для морфофункционального анализа. Для визуализации морфологии нейронов культуру клеток гиппокампа трансфецировали плазмидой pCSGFP2:td-tomato (Addgene, #30530), кодирующей красный флуоресцентный белок, либо плазмидой, кодирующей зеленый флуоресцентный белок pLV-eGFP (Addgene, #25999), методом кальций-фосфатной трансфекции на 7 сутки культивирования при помощи набора (Clontech Laboratories Inc., #631312) по протоколу производителя с некоторыми рекомендациями, согласно статье [Jiang M. et al., 2006]. Для оценки результатов иммуно-

флуоресцентного окрашивания, а также для анализа морфологии шипиков проводили исследование с использованием системы компьютерного анализа микроскопических изображений. Полученные с помощью конфокального микроскопа изображения препаратов кортико-стриатных и гиппокампальных культур нейронов анализировали, и проводили трехмерную реконструкцию дендритного дерева нейрона и автоматизированный подсчет шипиков. Также данное программное обеспечение предоставляет возможность измерять длину отростков на основе данных размера пикселя при конфокальной микроскопии, задавать параметры для детектирования разных типов шипиков: пенькового, тонкого или грибовидного. Таким образом, программа детектирует разные типы шипиков точками различных цветов. Мы использовали следующие параметры для анализа шипиков: min stubby size (минимальный размер пенькового шипика) – 26, non stubby size (минимальный размер непенькового) – 36. Плотность распределения шипиков определяли как среднее количество шипиков на 10 мкм длины дендрита.

Статистическая обработка экспериментальных данных включала в себя подсчет среднего арифметического, стандартного отклонения и доверительного интервала для каждой выборки и проводилась в программе Statistica 6.0. Непараметрический U-критерий Манна–Уитни использовался для проверки гипотезы о том, что сравниваемые независимые выборки отличаются друг от друга.

2.5. Влияние пептида EDR на количество шипиков нейронов в модели болезни Альцгеймера

Влияние пептида EDR на количество шипиков в культуре нейронов гиппокампа у мышей линии PS1-M146V-KI (модель болезни Альцгеймера в отсутствие амилоидной синапсотоксичности)

В модели БА на нокиновых мышях линии PS1-M146V-KI пептид EDR не оказывал нейропротекторного действия на нейроны. Только в контрольных культурах были найдены здоровые трансфицированные нейроны (рис. 2.5–2.14 даны на вклейке). На рисунке видно, что в контроле нейроны жизнеспособные, на них можно различить формирование разветвленной сети и наличие шипиков. На фотографиях культур, в которые добавляли пептид EDR, можно различить только тела нейронов (рис. 2.6). Таким образом, в данной модели исследование не дало репрезентативных результатов

вследствие низкой способности нейронов, полученных от нокиновских мышечных линий PS1-M146V-KI, расти в культуре при добавлении изучаемых пептидов.

***Влияние пептида EDR на количество шипиков
в культуре нейронов гиппокампа в условиях
амилоидной синапсотоксичности (модель болезни Альцгеймера)***

В отличие от предыдущей модели БА, в модели амилоидной синапсотоксичности использовали культуры нейронов гиппокампа, полученные от здоровых мышечных линий C57BL/6 (B6). Условия синапсотоксичности были смоделированы путем добавления синтетических олигомерных пептидов A β 42 в культуральную среду. Ранее было показано, что добавление синтетических пептидов A β 42 приводит к нарушению синаптических контактов и снижению процента грибовидных шипиков на дендритах нейронов гиппокампа.

При изучении влияния пептида EDR на количество шипиков в культурах нейронов гиппокампа в условиях амилоидной синапсотоксичности в модели БА были исследованы грибовидные шипики – дендритные шипики, обладающие большой головкой и тонкой шейкой, так как считается, что именно грибовидный шипик, имеющий наибольший размер и объем постсинаптической плотности, является стабильным синаптическим контактом, отвечающим за хранение памяти. Полагают, что именно грибовидные шипики претерпевают наиболее серьезные изменения при развитии БА, что приводит к ухудшению памяти пациентов.

Количество грибовидных шипиков в нейронах гиппокампа мышечной линии C57BL/6 в контроле составило $(37,7 \pm 2,1)\%$. При добавлении синтетических олигопептидов A β 42 (создание амилоидной синапсотоксичности – модель БА) количество грибовидных шипиков нейронов гиппокампа уменьшилось на 34% и составило $(24,9 \pm 1,8)\%$ (рис. 2.7 и 2.8, см. на вклейке).

После добавления в культуру нейронов гиппокампа в условиях амилоидной синапсотоксичности пептида EDR в концентрации 20 нг/мл количество грибовидных шипиков достоверно увеличилось на 35% и составило $(33,6 \pm 2,5)\%$. При добавлении пептида EDR в концентрации 200 нг/мл наблюдалось не только восстановление количества грибовидных шипиков с $(24,9 \pm 1,8)\%$ до контрольного значения $(37,7 \pm 2,1)\%$, но и некоторое увеличение количества грибовидных шипиков по сравнению с контролем (культура без добавления олигопептидов A β 42) до $(42,6 \pm 1,7)\%$. Таким образом, пептид EDR в концентрации 200 нг/мл способствовал восста-

новлению количества грибовидных шипиков нейронов в модели БА на 71% от уровня контроля (см. рис. 2.7 и 2.8).

Пептид EDR оказывал нейропротекторный эффект по отношению к грибовидным шипикам в культуре нейронов гиппокампа в условиях амилоидной синаптотоксичности в обеих исследуемых концентрациях: 20 и 200 нг/мл. Сравнивая этот результат с ранее полученными данными, можно предположить, что пептид EDR проникает в ядро нейрона, связывается с ДНК и запускает или ингибирует экспрессию генов, ответственных за функциональную активность и пластичность нейронов, вследствие чего наблюдается восстановление грибовидных шипиков и синаптических контактов между нейронами гиппокампа в модели амилоидной синаптотоксичности.

Кроме того, велика вероятность, что пептид EDR входит в состав полипептидного комплекса коры головного мозга телят (лекарственный препарат Кортексин). Вполне возможно, что с этим связан схожий эффект пептида EDR с Кортексином на уровне морфологии нейронов. Как было показано в предыдущих исследованиях, Кортексин повышает выделение дофамина из аксонов нейронов стриатума и одновременно подавляет взаимодействие дофамина с пре- и постсинаптическими рецепторами, что объясняет широкий спектр его нейропротекторного действия. Также нейропротекторные свойства Кортексина обусловлены его способностью снижать апоптоз и стимулировать пролиферацию нейронов.

2.6. Влияние пептида EDR на количество шипиков нейронов в модели болезни Хантингтона

В работе использовали первичную кортико-стриатную культуру нейронов, полученную от мышей дикого типа и мышей линии YAC128, несущих мутантный аллель НТТ человека. Вследствие данной мутации образуется mHtt. У мышей этой линии симптомы заболевания наиболее выражены и проявляются достаточно быстро. Кроме того, у этих животных с возрастом прогрессируют когнитивные и моторные нарушения, развивается частичная потеря нейронов в стриатуме и коре. Удлинение полиглутаминовой последовательности, которое является причиной образования mHtt, изменяет конформацию белка Htt и прочно соединяет его с другими белками. Это приводит к агрегации Htt, при этом образуются так называемые внутриклеточные тельца включения. Эти включения механически препятствуют движению везикул, содержащих нейромедиаторы, через цитоскелет, что нарушает передачу сигналов в нейронах. Тельца включения обнаруживают как в ядрах клеток,

так и в цитоплазме. Некоторые эксперименты показали, что они могут быть токсичны для клеток, а другие — что тельца, наоборот, защищают нейрон от апоптоза, аккумулируя мутантный хантингтин, и именно неагрегированный белок токсичен.

Существует несколько путей, при которых mHtt вызывает гибель нейронов. К ним относят: влияние на шапероны, взаимодействие с каспазами, токсическое действие глутамина на нервные клетки. При изучении БХ показано, что мутантный белок Htt специфически связывается с рецепторами инозитол-1,4,5-трисфосфата первого типа на мембране клетки и активирует их. Ключевое значение активации инозитол-1,4,5-трисфосфатного рецептора для нейротоксичности mHtt было подтверждено в экспериментах на культуре СШН мышей в модели БХ, а также в генетических экспериментах в модели БХ на *Drosophila melanogaster*. В первичных культурах СШН стриатума трансгенных мышей (линия YAC128), являющихся моделью БХ, увеличиваются выброс Ca^{2+} из внутриклеточных депо и глутаматная токсичность. Кальциевые блокаторы защищают СШН при БХ от глутаматной токсичности. Показано, что активация дофаминовых рецепторов приводит к усилению Ca^{2+} ответа в БХ СШН и повышению глутаматной токсичности. В экспериментах в модели БХ на мышах блокатор дофаминовой сигнализации тетрабеназин замедлял развитие моторных симптомов и уменьшал потерю нейронов стриатума.

По описанной выше методике нейроны коры и стриатума в культуре формировали разветвленную сеть, что было подтверждено с помощью иммуноцитохимического окрашивания нейронов на наличие двух белков — MAP2 (маркер нейронов) и DARPP-32 (маркер СШН стриатума). Как видно на рис. 2.9, А, в культуре присутствуют как нейроны, экспрессирующие DARPP-32 — СШН, так и нейроны, экспрессирующие только MAP2 — нейроны коры. Кроме того, на дендритах СШН можно различить шипики на рис. 2.9, Б. Формирование разветвленной сети и наличие отростков в смешанных культурах было подтверждено как для культур дикого типа, так и для культур нейронов мышей линии YAC128 (рис. 2.10, см. на вклейке).

***Изменение количества шипиков нейронов
в кортико-стриатной культуре при ее старении
в норме и в модели болезни Хантингтона***

Количество шипиков в кортико-стриатной культуре нейронов мышей дикого типа на 14 и 21 сутки культивирования достоверно не изменялось и составило соответственно $(9,8 \pm 0,4)$ и $(9,9 \pm 0,4)$

шипиков на 10 мкм длины дендрита (рис. 2.11 и 2.12, см. на вклейке). Количество шипиков у мышей линии YAC128 на 14 сутки культивирования составило $(9,6 \pm 0,5)$ шипиков на 10 мкм длины дендрита. При старении кортико-стриатной культуры мышей линии YAC128 наблюдалось уменьшение количества шипиков на 25% по сравнению со значением количества шипиков на 14 сутки культивирования, которое составило $(7,2 \pm 0,5)$ шипиков на 10 мкм длины дендрита, и на 27% по сравнению с диким типом на 21 сутки культивирования.

Полученные данные показывают, что в кортико-стриатной культуре при ее старении при БХ происходят морфологические изменения строения шипиков и их элиминация. Это приводит к нарушению синаптических связей между нейронами стриатума и коры. Количество шипиков на 21 сутки культивирования у мышей линии YAC128 уменьшалось на 25% по сравнению с 14 сутками культивирования. Эти данные согласуются с полученными ранее результатами.

***Влияние пептида EDR на количество шипиков нейронов
стриатума в кортико-стриатной культуре нейронов
в норме и в модели болезни Хантингтона***

При исследовании влияния пептида EDR на количество шипиков в нейронах кортико-стриатной культуры мышей линии YAC128 было установлено, что пептид в концентрации 20 нг/мл не влияет на количество шипиков, число которых составило $(7,5 \pm 0,4)$ на 10 мкм длины дендрита (рис. 2.13 на вклейке). Однако добавление пептида EDR в концентрации 200 нг/мл способствовало изменению морфологии нейронов культуры YAC128 на 21 сутки культивирования. Добавление пептида EDR приводило к изменению формы шипиков, которые приобретали вид филоподий (рис. 2.14 на вклейке). Филоподии – выпячивания дендрита, похожие на шипики, но длиннее его в 2–3 раза. Все нейроны в процессе развития проходят этап дендритных филоподий. Филоподии – динамичные структуры, способные изменять свою форму в течение короткого времени, преобразуясь в шипики или редуцируясь. Однако после дифференцировки нейрона филоподии исчезают. Таким образом, образование филоподий после добавления пептида EDR может быть связано с незавершенной попыткой дендрита образовать функциональный контакт с аксоном кортикального нейрона.

При добавлении пептида EDR в концентрации 200 нг/мл наблюдалось увеличение количества шипиков на 35% с $(7,2 \pm 0,5)$ до

($9,7 \pm 0,3$) на 10 мкм длины дендрита (см. рис. 2.13). При добавлении пептида EDR в кортико-стриатную культуру нейронов, полученных от мышей дикого типа, на 14 и 21 сутки культивирования изменения количества шипиков не наблюдалось (см. рис. 2.13).

Таким образом, пептид EDR в модели БХ показал выраженные нейропротекторные свойства. Пептид EDR способствовал восстановлению морфологии и количества шипиков нейронов коры и стриатума головного мозга мышей линии YAC128 при старении кортико-стриатной культуры. Ранее было установлено, что пептид EDR обладает нейропротекторным действием у лиц пожилого возраста. Кроме того, известен фармакопейный препарат Семакс, который обладает антигипоксическими, антиоксидантными, ноотропными свойствами, сходный с пептидом EDR. При этом указанными эффектами обладают и метаболиты Семакса – трипептиды. В исследовании на лицах пожилого и старческого возраста с начальной стадией БХ при интраназальном применении Семакс повышал качество жизни, улучшал двигательную и социальную активность, долговременную и кратковременную память пациентов. При этом действие Семакса на культурах нейронов не было изучено. Возможно, пептид EDR, обладающий схожими свойствами, может быть перспективным препаратом для лечения БХ.

Заключение

Формирование дендритов является важным этапом в процессе нейрогенеза, обеспечивая взаимодействие нейронов и функционирование нейронных сетей. При этом дендритное дерево представляет собой динамичную структуру, с одной стороны, изменяющуюся под действием афферентных сигналов, а с другой – поддерживаемую постсинаптическими сигналами. Показано нарушение морфологии дендритов, включая изменения количества шипиков, при развитии НДЗ и психических заболеваний. Эти нарушения наблюдаются при БА и БХ в головном мозге людей и при моделировании БА и БХ на животных.

В работе впервые было изучено влияние пептидов EDR и KED на формирование шипиков в нейронах стриатума в смешанной кортико-стриатной культуре, полученной от мышей линии YAC128 (модель БХ) и в нейронах гиппокампа, полученной от мышей линии C57BL/6 и линии PS1-M146V-KI (модель БА). Было установлено, что пептид EDR оказывал нейропротекторные действия в моделях БХ и БА. При исследовании влияния пептида EDR на количество шипиков в нейронах кортико-стриатной культуры мы-

шей линии YAC128 было установлено, что пептид в концентрации 200 нг/мл достоверно увеличивал количество шипиков на 35% по сравнению с этим показателем у мышей с геном мутантного хантингтина человека на 21 сутки культивирования без добавления пептида. При добавлении пептида EDR в концентрации 20 нг/мл достоверного изменения количества шипиков не происходило, но изменялась морфология шипиков – образовывались филоподии – выпячивания дендрита, похожие на шипики, но длиннее его в 2–3 раза. Филоподии являются динамичной структурой. Образование филоподий после добавления пептида EDR могло быть связано с попыткой дендрита образовать функциональный контакт с аксоном кортикального нейрона, но данной концентрации было недостаточно.

Так как в экспериментах на мышинной модели БХ (мышь линии YAC128) применение Дантролена и Тетрабеназина значительно улучшало поведение в тестах у мышей, а также уменьшало потери стриатальных нейронов и образования ядерных агрегатов мутантного хантингтина, можно предположить, что пептиды EDR и KED, которые оказывали нейропротекторный эффект на нейроны стриатума в кортико-стриатной культуре, дадут подобный положительный эффект *in vivo* в этой же мышинной модели БХ.

При изучении влияния пептида EDR на количество грибовидных шипиков в нейронах гиппокампа в условиях амилоидной синаптотоксичности (модель БА) установлено, что пептид EDR также оказывал положительный эффект на формирование грибовидных шипиков в концентрациях пептида 20 и 200 нг/мл. После добавления в культуру нейронов гиппокампа в условиях амилоидной синаптотоксичности пептида EDR в концентрации 20 нг/мл количество грибовидных шипиков достоверно увеличивалось на 35%. При добавлении пептида EDR в концентрации 200 нг/мл наблюдалось не только восстановление количества грибовидных шипиков до контрольного значения, но и некоторое увеличение количества грибовидных шипиков по сравнению с контролем (культура без добавления олигопептидов A β 42). Таким образом, пептид EDR в концентрации 200 нг/мл способствовал восстановлению количества грибовидных шипиков нейронов в модели БА на 71% от уровня контроля.

Полученные данные позволяют заключить, что пептид EDR оказывал нейропротекторный эффект, восстанавливая количество шипиков дендритов нейронов в моделях БА и БХ на животных. Ранее было установлено, что короткие пептиды проникают в ядро клетки, взаимодействуют с ДНК и регулируют экспрессию генов, которые способствуют улучшению функциональной активности

клеток в различных тканях. Скорее всего, нейропротекторный эффект пептида EDR связан с влиянием на экспрессию генов, обеспечивающих пластичность нейронов и их функционирование.

Пептид KED не оказывал такого выраженного положительного эффекта при изучении его влияния на восстановление шипиков в нейронах стриатума в смешанной кортико-стриатной культуре, полученной от мышей линии YAC128 (модель БХ) и в нейронах гиппокампа в гиппокампальной культуре, полученной от мышей линии C57BL/6. При добавлении пептида KED в концентрациях 20 и 200 нг/мл в смешанную кортико-стриатную культуру нейронов, полученную от мышей линии YAC128, достоверного изменения количества шипиков не наблюдалось. В модели БА при добавлении пептида KED в концентрации 20 нг/мл статистически значимых отличий в количестве грибовидных шипиков от группы с добавлением олигопептидов A β 42 обнаружено не было. При этом в концентрации 200 нг/мл пептид KED повышал количество грибовидных шипиков на 20% по сравнению с группой с добавлением A β 42, но полного восстановления грибовидных шипиков не происходило. Возможно, данный эффект связан с неспецифическим действием этого трипептида. Ранее было показано, что пептиды EDR и KED оказывали положительное влияние при сочетанном лечении НДЗ. Возможно, применение ангиопротекторного пептида KED, в дополнение к пептиду EDR, эффективно потому, что одной из причин НДЗ является сосудистая недостаточность и, как следствие, недостаточное насыщение нейронов головного мозга кислородом. Оба пептида не оказывали негативного воздействия на культуры клеток, так как при добавлении пептидов в культуры, полученные от мышей дикого типа, количество шипиков достоверно не изменялось, что свидетельствует об отсутствии их нейротоксичности.

Ранее было показано, что предварительная обработка культуры гиппокампальных нейронов в мышинной модели Thy-1-YFP Мемантином перед облучением предотвращала потерю шипиков и синаптических контактов. В дальнейшем целесообразно проверить нейропротекторные свойства исследуемых пептидов и на других мышинных моделях. Скорее всего, данные пептиды окажут положительный нейропротекторный эффект.

Таким образом, пептид EDR, будучи представителем пула геропротекторных пептидов, является одним из перспективных нейропротекторов для дальнейшего изучения как вещество, эффективное в лечении БА и БХ.

Литература

1. Артамонов Д.Н., Коржова В.В., Ву Д. и др. Нарушения синаптической передачи при болезни Хантингтона на кортико-стриатной модели культуры нейронов // Биологические мембраны. 2013. Т. 30, № 4. С. 1–13.
2. Гривенников И.А., Долотов О.В., Гольдина Ю.И. Факторы пептидной природы в процессах пролиферации, дифференцировки и поддержания жизнеспособности клеток нервной системы млекопитающих // Молекулярная биология. 1999. Т. 33, № 1. С. 120–126.
3. Татарникова О.Г., Орлов М.А., Бобкова Н.В. Бета-амилоид и Тау-белок: структура, взаимодействие и прионоподобные свойства // Успехи биологической химии. 2015. Т. 55. С. 351–390.
4. Угрюмов М.В. Новые представления о патогенезе, диагностике и лечении нейродегенеративных заболеваний // Вестник РАМН. 2010. Т. 8. С. 6–19.
5. Bateup H.S., Svenningsson P., Kuroiwa M. et al. Cell type-specific regulation of DARPP-32 phosphorylation by psychostimulant and antipsychotic drugs // Nature Neuroscience. 2008. Vol. 11. P. 932–939.
6. Bekris L., Yu. C., Bird T., Tsuang D. Genetics of Alzheimer disease // Journal of Geriatric Psychiatry and Neurology. 2010. Vol. 23. P. 213–227.
7. Bezproznyanny I., Hayden M.R. Deranged neuronal calcium signaling and Huntington disease // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2004. Vol. 322. P. 1310–1317.
8. Bhalla A., Vetanovetz C., Morel E. et al. The location and trafficking routes of the neuronal retromer and its role in amyloid precursor protein transport // Neurobiological Diseases. 2012. Vol. 47. P. 126–134.
9. Biagioli M., Ferrari F., Mendenhall E.M. Htt CAG repeat expansion confers pleiotropic gains of mutant huntingtin function in chromatin regulation // Human Molecular Genetics. 2015. Vol. 24. P. 2442–2457.
10. Bicanic I., Hladnik A., Petanjek Z.A. Quantitative Golgi study of dendritic morphology in the mice striatal medium spiny neurons // Front Neuroanat. 2017. Vol. 11. P. 37.
11. Bohm C., Chen F., Sevalle J. et al. Current and future implications of basic and translational research on amyloid- β peptide production and removal pathways // Molecular and Cellular Neurosciences. 2015. Vol. 66. P. 3–11.
12. Bourne J., Harris K.M. Do thin spines learn to be mushroom spines that remember? // Current Opinion in Neurobiology. 2007. N 17(3). P. 381–386.
13. Cattaneo E., Rigamonti D., Goffredo D. et al. Loss of normal huntingtin function: new developments in Huntington's disease research // Trends Neuroscience. 2001. Vol. 24. P. 182–188.
14. Chen Y.C. Impact of a discordant helix on β -amyloid structure, aggregation ability and toxicity // Eur. Biophys. J. 2017. N 46(7). P. 681–687.
15. Chen X., Wu J., Lvovskaya S. et al. Dantrolene is neuroprotective in Huntington's disease transgenic mouse model // Molecular Neurodegeneration. 2011. Vol. 6. P. 81.
16. Ciarochi J.A., Calhoun V.D., Lourens S. et al. PREDICT-HD investigators and coordinators of the huntington study group. Patterns of Co-occurring gray matter concentration loss across the Huntington disease prodrome // Frontiers in Neurology. 2016. Vol. 7. P. 147.
17. D'Andrea M.R., Howanski R.J., Saller C.F. MAP2 IHC detection: a marker of antigenicity in CNS tissues // Biotech. Histochemistry. 2017. Vol. 92(5). P. 363–373.

18. *Dauphinot V., Delphin-Combe F., Mouchoux C.* et al. Risk factors of caregiver burden among patients with Alzheimer's disease or related disorders: a cross-sectional study // *J. Alzheimers Dis.* 2015. N 44(3). P. 907–916.
19. *Dauphinot V., Ravier A., Novais T.* et al. Relationship between comorbidities in patients with cognitive complaint and caregiver burden: A cross-sectional study // *J. of the American medical directors association.* 2016. Vol. 17(3). P. 232–237.
20. *de Calignon A., Polydoro M., Suárez-Calvet M.* et al. Propagation of tau pathology in a model of early Alzheimer's disease // *Neuron.* 2012. Vol. 73. P. 685–697.
21. *Dehmelt L., Halpain S.* The MAP2/Tau family of microtubule-associated proteins // *Genome Biol.* 2005. P. 204–206.
22. *Hering H., Sheng M.* Dendritic spines: structure, dynamics and regulation // *Nature Rev. Neurosci.* 2001. Vol. 2(12). P. 880–888.
23. *Humpel C.* Platelets: their potential contribution to the generation of beta-amyloid plaques in Alzheimer's disease // *Current Neurovascular Research.* 2017. N 14(3). P. 290–298.
24. *Ishikawa M., Mizukami K., Iwakiri M., Asada T.* Immunohistochemical and immunoblot analysis of Dopamine and cyclic AMP-regulated phosphoprotein, relative molecular mass 32,000 (DARPP-32) in the prefrontal cortex of subjects with schizophrenia and bipolar disorder // *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry.* 2007. Vol. 31, N 6. P. 1177–1181.
25. *Jiang M., Chen G.* High Ca²⁺-phosphate transfection efficiency in low-density neuronal cultures // *Nat. Protoc.* 2006. Vol. 1(2). P. 695–700.
26. *Jiang Y., Di Gregorio S.E., Duennwald M.L., Lajoie P.* Polyglutamine toxicity in yeast uncovers phenotypic variations between different fluorescent protein fusions // *Traffic.* 2017. Vol. 18(1). P. 58–70.
27. *Kanjhan R., Noakes P.G., Bellingham M.C.* Emerging roles of filopodia and dendritic spines in motoneuron plasticity during development and disease // *Neural. Plasticity.* 2016. 3423267. P. 1–31.
28. *Khavinson V.Kh., Linkova N.S., Kukanova E.O.* et al. Neuroprotective effect of EDR peptide in mouse model of Huntington disease // *J. of Neurology and Neuroscience.* 2017. Vol. 8(1). P. 1–11.
29. *Vanyushin B.F., Khavinson V.Kh.* Short biologically active peptides as epigenetic modulators of gene activity // *Epigenetics – a different way of looking at genetics* / Eds W. Doerfler, P. Böhm. Springer International Publishing Switzerland, 2016. P. 69–90.
30. *Kraskovskaya N.A., Kukanova E.O., Linkova N.S.* et al. Tripeptides restore the number of neuronal spines under conditions of *in vitro* modeled Alzheimer's disease // *Bulletin of Experimental Biology and Medicine.* 2017. Vol. 163, N 4. P. 550–553.
31. *Montagna E., Dorostkar M.M., Herms J.* The role of APP in structural spine plasticity // *Frontiers of Molecular Neuroscience.* 2017. Vol. 10. P. 136.
32. *Nimchinsky E.A., Sabatini B.L., Svoboda K.* Structure and function of dendritic spines // *Ann. Physiological Rev.* 2002. Vol. 64. P. 313–353.
33. *Nussbaum J., Schilling S., Cynis H.* et al. Prionlike behaviour and tau-dependent cytotoxicity of pyroglutamylated amyloid- β // *Nature.* 2012. Vol. 485. P. 651–655.
34. *Ostrovskaya R.U., Gruden M.A., Bobkova N.A.* The nootropic and neuroprotective proline-containing dipeptide noopept restores spatial memory and increases immunoreactivity to amyloid in an Alzheimer's disease model // *J. Psychopharmacol.* 2007. Vol. 6. P. 611–619.

35. *Paltsev M.A., Zuev V.A., Kozhevnikova E.O.* et al. Molecular markers of early diagnosis of Alzheimer disease: Prospects for research in peripheral tissues // *Advances in Gerontology*. 2018. Vol. 8, N 2. P. 110–117.
36. *Pchitckaia E., Vlasova O., Bezprozvanny I.* Mechanisms, clinical strategies, and promising treatments of neurodegenerative diseases // 12th International Conference AD/PD. Abstracts. *Neurodegenerative Diseases*. 2015. Vol. 15(1). P. 1–1969.
37. *Popugaeva E., Bezprozvanny I.* Role of endoplasmic reticulum Ca²⁺ signaling in the pathogenesis of Alzheimer disease // *Frontiers of Molecular Neuroscience*. 2013. Vol. 6. P. 1–7.
38. *Popugaeva E., Pchitskaya E., Speshilova A.* et al. STIM2 protects mushroom synaptic spines from amyloid // *Molecular Neurodegeneration*. 2015. Vol. 10. P. 37.
39. *Popugaeva E., Supnet C., Bezprozvanny I.* Presenilins, deranged calcium homeostasis, synaptic loss and dysfunction in Alzheimer's disease // *Messenger*. 2012. Vol. 1. P. 53–62.
40. *Rocheffort N.L., Konnerth A.* Dendritic spines: from structure to in vivo function // *EMBO reports*. 2012. Vol 13. P. 699–708.
41. *Shadrina M., Kolomin T., Agapova T.* Comparison of the temporary dynamics of NGF and BDNF gene expression in rat hippocampus, frontal cortex, and retina under Semax action // *J. Mol. Neurosci*. 2010. Vol. 41, N 1. P. 30–35.
42. *Slow E.J., van Raamsdonk J., Rogers D.* et al. Selective striatal neuronal loss in a YAC128 mouse model of Huntington disease // *Hum. Mol. Genet*. 2003. Vol. 12. P. 1555–1567.
43. *Svenningsson P., Nishi A., Fisone G.* et al. DARPP-32: an integrator of neurotransmission // *Annu Rev. Pharmacol Toxicol*. 2004. Vol. 44. P. 269–296.
44. *Sun S., Zhang H., Liu J.* et al. Reduced synaptic STIM2 expression and impaired store-operated calcium entry cause destabilization of mature spines in mutant presenilin mice // *Neuron*. 2014. Vol. 82. P. 79–93.
45. *Switonski P.M., Szlachcic W.J., Gabka A.* et al. Mouse models of polyglutamine diseases in therapeutic approaches: Review and data table. Pt. II // *Molecular Neurobiology*. 2012. Vol. 46(2). P. 430–466.
46. *Tackenberg C., Ghorri A., Brandt R.* Thin, stubby or mushroom: spine pathology in Alzheimer's disease // *Current Alzheimer Results*. 2009. Vol. 6(3). P. 261–268.
47. *Tang L., Lu Y., Zheng W., Li Y.* Overexpression of MAP2 via formation of microtubules plays an important role in the sprouting of mossy fibers in epileptic rats // *J. Molecular Neuroscience*. 2014. Vol. 53(1). P. 103–108.
48. *Tang T.S., Guo C., Wang H.* et al. Neuroprotective effects of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor C-terminal fragment in a Huntington's disease mouse model // *J. Neuroscience*. 2009. Vol. 29. P. 1257–1266.
49. *Tang T.-S., Tu H., Chan E.Y.* et al. Huntingtin and huntingtin-associated protein 1 influence neuronal calcium signaling mediated by inositol-(1,4,5) triphosphate receptor type 1 // *Neuron*. 2003. Vol. 39. P. 227–239.
50. *Tang T.-S., Slow E.J., Lupu V.* et al. Disturbed Ca²⁺ signaling and apoptosis of medium spiny neurons in Huntington's disease // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 2005. Vol. 102. P. 2602–2607.
51. *Tashiro A., Yuste R.* Structure and molecular organization of dendritic spines // *Histology and Histopathology*. 2003. Vol. 18. P. 617–634.
52. *Tjia M., Yu X., Jammu L.S.* et al. Pyramidal neurons in different cortical layers exhibit distinct dynamics and plasticity of apical dendritic spines // *Frontiers in Neural Circuits*. 2017. Vol. 11. P. 43.

53. *Torres K.C., Souza B.R., Miranda D.M.* et al. The leukocytes expressing DARPP-32 are reduced in patients with schizophrenia and bipolar disorder // *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*. 2009. Vol. 33. N 2. P. 214–219.
54. *Wang H., Chen X., Li Y.* et al. Tetrabenazine is neuroprotective in Huntington's disease mice // *Molecular Neurodegeneration*. 2010. Vol. 5. P. 18.
55. *Wu J., Ryskamp D.A., Liang X.* et al. Enhanced store-operated calcium entry leads to striatal synaptic loss in a Huntington's disease mouse model // *J. Neuroscience*. 2016. Vol. 36(1). P. 125–141.
56. *Zhang H., Li Q., Graham R.K.* et al. Full length mutant huntingtin is required for altered Ca²⁺ signaling and apoptosis of striatal neurons in the YAC mouse model of Huntington's disease // *Neurobiology of Disease*. 2008. Vol. 31. P. 80–88.

Глава 3

Биофизические аспекты взаимодействия пептида EDR с ДНК и гистоновыми белками

3.1. Проникновение коротких пептидов в клетку и взаимодействие с ДНК и гистоновыми белками: факты и гипотезы

Короткие пептиды, состоящие не более чем из 20 аминокислотных остатков, являются сигнальными молекулами, участвующими в регуляции гомеостаза на различных уровнях организации живой материи.

Результаты многолетних исследований привели к заключению, что активность коротких пептидов является селективной или тканеспецифической. Была предложена модель развития патологических процессов, согласно которой ключевую роль в них играют нарушения пептидергической регуляции. Коррекция таких нарушений путем дополнительного введения в организм коротких пептидов должна приводить к регрессии патологического процесса и нормализации нарушенных функций организма. Таким образом, были установлены главные преимущества низкомолекулярных пептидов по сравнению с высокомолекулярными белковыми регуляторами: они обладают высокой биологической активностью, проявляют тканеспецифичность, у них отсутствуют видоспецифичность и иммуногенность. Длительный характер действий, производимых эндогенными пептидами, позволяет предположить, что по крайней мере некоторые из них влияют на изменения активности генов, что может быть справедливо и для синтетических пептидных соединений.

В настоящее время благодаря развитию эпигенетики и пептидной биотехнологии можно предложить схему взаимодействия пептидов с мембраной клетки и ДНК, позволяющую объяснить их высокую биологическую активность.

Проникновение коротких пептидов в цитоплазму и ядро клетки

Еще в конце прошлого столетия было установлено, что короткие пептиды, синтезированные на основе Tat-белка (активатор транскрипции вирусного генома иммунодефицита человека HIV-1), способны проникать внутрь клетки. Эти пептиды были созданы в качестве трансмембранных носителей для лекарственных веществ. Так возник термин cell-penetrating peptides (CPP), объединяющий пептиды, транспортирующие в клетку белки, нуклеиновые кислоты и липосомы.

Многолетние наблюдения показали, что проникновение в клетку через мембрану чаще всего свойственно щелочным пептидам, содержащим в структуре избыток положительно заряженных аминокислотных остатков. Преимущество этих пептидов заключается в том, что они легко преодолевают слой кислого гликокаликса, который прилегает к клеточной мембране. Для синтетических щелочных и амфифильных пептидов, содержащих в структуре несколько остатков лизина, была показана не только способность проникать в клетку, но и образовывать комплексы с ДНК и РНК. При этом было установлено, что связывание этих пептидов с ДНК приводит к упрочнению ее двойной спирали. Эти олигопептиды также относятся к семейству CPP, так как предназначены для транспортной функции – переноса биологически активных веществ через клеточную мембрану. Кроме функции переносчика, эти пептиды способны одновременно конденсировать ДНК, блокировать клеточный метаболизм, проникать в ядро и связывать клеточные рецепторы.

Непосредственное взаимодействие пептида с мембраной определяется электростатическим взаимодействием положительно заряженных боковых групп аминокислотных остатков аргинина и лизина с отрицательными карбоксильными группами фосфатидилсерина, экспонированными на внешней стороне цитоплазматической мембраны. Для отрицательно заряженных (карбоксильных) боковых групп пептидов центрами связывания являются положительно заряженные группы фосфатидилхолина и фосфатидилэтаноламина. Таким образом, основным механизмом проникновения коротких пептидов через цитоплазматическую мембрану может являться пиноцитоз (рис. 3.1, см. на вклейке).

Важным экспериментальным фактом, подтверждающим способность коротких пептидов проникать в клетку, стало исследование, показавшее, что FITC-меченые ди-, три- и тетрапептиды проникают не только в цитоплазму, но и в ядро и ядрышко клеток HeLa. Клетки HeLa инкубировали с FITC-мечеными пепти-

дами 12 часов. При этом в образцах культур клеток под воздействием пептидов флуоресценция была обнаружена в цитоплазме, ядре и ядрышке в виде многочисленных мелких гранул, тогда как в контрольных образцах флуоресценция не наблюдалась. Относительная интенсивность флуоресценции разных меченых пептидов в ядрах клеток HeLa различна. Более сильная флуоресценция была выражена при инкубации клеток с FITC-мечеными пептидами EDR и AEDG, в меньшей степени – с пептидом KEDG. В связи с этим рассмотрим возможный механизм проникновения коротких пептидов в ядро более подробно. Ядро эукариотических клеток имеет систему транспортных пор (нуклеопор), образованных белковыми комплексами нуклеопоринами. Внутренний диаметр нуклеопор составляет около 50 нм, следовательно, они проницаемы для свободно диффундирующих низкомолекулярных веществ с молекулярной массой до 3,5 кДа (рис. 3.2, см. на вклейке).

Таким образом, возможность проникновения коротких пептидов, обладающих такими характеристиками, как заряд, размер и гидрофобность, через цитоплазматическую и ядерную мембрану является вполне обоснованной. Транспорт веществ определяется сочетанием их стерических и физико-химических свойств.

***Возможность связывания пептида с ДНК
и эпигенетическая регуляция транскрипции генов
с участием коротких пептидов***

Полученные результаты позволяют рассмотреть возможность непосредственного взаимодействия коротких регуляторных пептидов с ДНК. В последние годы все большее распространение для анализа наноструктур, к которым относятся короткие пептиды, получил метод молекулярного моделирования.

Сравнение пространственного расположения функциональных групп на поверхности большой канавки двуспиральной ДНК и боковых групп регуляторных пептидов показало, что эти полиамфолитные структуры имеют возможность многоточечного взаимодействия.

Существование специфического связывания пептидов с одноцепочечными олигонуклеотидами может иметь особое значение для эпигенетического механизма регуляции экспрессии генов. В ДНК всегда есть или появляются одотяжевые участки (цепи), в особенности они возникают при репликации, рекомбинации и репарации генома. Взаимодействие коротких пептидов именно с такими участками может направленно контролировать и эти генетические

процессы. Кроме того, связывание коротких пептидов (тетрапептид Эпиталон) с ДНК сопровождается локальным расплетением цепей ДНК, что может приводить к появлению одנותяжевых мишеней для связывания пептидов с ДНК. Это приобретает особый смысл при возможном сочетанном действии в клетке разных пептидов, когда одни служат индукторами возникновения одנותяжевых структур в геноме, а другие благодаря этому – собственно инициаторными регуляторными исполнителями биологического эффекта.

Установлено, что короткие пептиды модулируют действие эндонуклеаз. Вероятно, модуляция пептидами действия эндонуклеаз происходит благодаря сайт-специфическому связыванию пептид-ДНК, которое защищает ДНК от ферментативного гидролиза. Модуляция действия эндонуклеаз пептидами в свою очередь модулируется гистонами (гистон H1), тем самым, в клетке (ядре) гистоны хроматина определенно могут влиять на связывание коротких пептидов с ДНК. Наряду с этим некоторые пептиды, по-видимому, могут контролировать гидролиз ДНК эндонуклеазами и на уровне взаимодействия пептида с ферментом.

Эпигенетика постулирует тканевую, субклеточную и возрастную специфичность метилирования ДНК и свидетельствует, что характер метилирования ДНК в раковых клетках иной, чем в нормальных. Принимая эти факты во внимание, можно предположить, что один и тот же биологически активный короткий пептид может по-разному связываться с ДНК в зависимости от характера ее метилирования и по-разному будет воздействовать на функции генов в различных тканях (клетках), в ядре и митохондриях, в молодых и старых клетках, в нормальных и злокачественных клетках.

Феномен модуляции действия эндонуклеаз короткими пептидами может быть лишь частью глобального биологического закона: сайт-специфично или комплементарно связывающиеся с ДНК (особенно с регуляторными последовательностями) пептиды должны модулировать функции практически всех или многих специфических белков, взаимодействующих с ДНК (РНК- и ДНК-полимеразы, ДНК-метилтрансферазы, репарирующие ДНК ферменты и многие регуляторные белки). Один из наиболее вероятных механизмов активации генов короткими пептидами следующий: пептиды селективно связываются с промоторными сайтами генов, что делает эти сайты недоступными для ферментов ДНК-метилтрансфераз и в результате промотор останется неметилованным, а это является решающим элементом активации большинства генов.

Таким образом, специфические (комплементарные) пептид-ДНК взаимодействия могут эпигенетически контролировать генетические функции клетки, и, вероятно, этот механизм играл важ-

ную роль уже на самых ранних этапах зарождения жизни и эволюции. Экспериментально выявленная возможность проникновения коротких пептидов в цитоплазму, ядро и ядрышко клеток и их участие в механизмах эпигенетической регуляции экспрессии генов дает объяснение их высокой биологической активности и успешного применения в качестве лекарственных препаратов, обладающих физиологически адекватным воздействием на клетки.

3.2. Исследование взаимодействия пептида EDR с ДНК *in vitro*

Информативным методом для изучения связывания пептида EDR с ДНК является использование водно-солевых растворов. Такое взаимодействие вряд ли может изменить последовательность нуклеотидов в цепи (первичную структуру ДНК), однако его влияние на вторичную и на третичную структуру ДНК способно существенно преобразовать целый ряд функциональных свойств макромолекулы, которые определяются высоким уровнем структурной организации полинуклеотидной цепи.

В водно-солевом растворе высокомолекулярная ДНК имеет конформацию статистического клубка. В достаточно широкой области рН молекула ДНК является полианионом, отрицательный заряд которого локализован на фосфатных группах. При продвижении в кислую область происходит протонирование азотистых оснований макромолекулы (гуанина, аденина, цитозина). Появление положительных групп с учетом большого отрицательного заряда цепи приводит к компактизации клубка с дальнейшим расплетением нитей вследствие кислотной денатурации ДНК. Наряду с кислотной денатурацией ДНК может наблюдаться также щелочная при увеличении рН до определенных значений. Щелочной денатурации предшествует появление дополнительного отрицательного заряда на азотистых основаниях (тимине, гуанине), возрастание электростатического отталкивания одноименно заряженных групп с увеличением изгибной жесткости двойной спирали и объема молекулярного клубка ДНК, которое при дальнейшем росте рН сменяется резким падением этих параметров. Конформация ДНК в значительной степени определяется электростатическими взаимодействиями. В связи с этим вопрос о взаимодействии ДНК в растворе с коротким пептидом, суммарный заряд которого отрицателен, вызывает значительный интерес.

Известно, что связывание аминокислот, входящих в состав белков, с пуриновыми и пиримидиновыми основаниями ДНК реали-

зуется для многих биологически значимых комплексов. Оно может осуществляться с помощью электростатических сил или путем образования водородных связей между определенными атомами аминокислотного остатка и азотистым основанием, при этом геометрия связей существенно отличается для азотистых оснований, находящихся в большой бороздке ДНК, и для азотистых оснований в малой бороздке.

Третичная структура двуспиральной ДНК в растворе определяется жесткостью и длиной полинуклеотидной цепи, а также взаимодействием полимер-растворитель. Полиэлектролитное набухание высокомолекулярной ДНК при уменьшении ионной силы раствора (снижении концентрации низкомолекулярных электролитов) существенно более значимо при этом, чем термодинамические объемные эффекты, обусловленные качеством растворителя, хотя их тоже необходимо учитывать при рассмотрении различных взаимодействий. Следует отметить также амфифильный характер полимерной цепи ДНК. Гидрофобные основания расположены внутри спирали и надежно защищены от контактов с водой гидрофильным сахарофосфатным остовом. Однако при взаимодействии ДНК с пептидами это обстоятельство также может сыграть свою роль, так как среди аминокислот можно найти такие, которые более охотно идут на контакт с гидрофобными группами, избегая окружения водой.

Для рассмотрения возможного взаимодействия пептида с ДНК использовали коммерческий препарат ДНК тимуса теленка фирмы Sigma с молекулярной массой $M = 9 \cdot 10^6$ г/моль, определенной по значению характеристической вязкости ДНК в 0,15 М NaCl.

Используемый пептид EDR (Glu-Asp-Arg) (рис. 3.3, см. на вклейке) получен методом пептидного синтеза в растворе. Молекула пептида EDR состоит из аминокислотных остатков глутаминовой и аспарагиновой кислот, боковые группы которых отрицательно заряжены при нейтральных pH, и аминокислотного остатка аргинина с положительно заряженной боковой группой. Следует учесть также положительный заряд N-концевой и отрицательный заряд C-концевой групп основной цепи. Суммарный заряд при нейтральных pH равен -1 . Масса молекулы пептида составляет 418,4 г/моль.

При изучении спектров поглощения растворов ДНК с пептидом EDR использовали диапазон длин волн 220–310 нм. Так как все белки имеют полосу поглощения пептидной группы $O=C-N-H$ в области 210–220 нм, а некоторые еще и полосы поглощения боковых групп аминокислотных остатков, спектр поглощения ДНК частично перекрывается с пептидным. Однако пептид EDR не имеет хромофоров, кроме пептидной связи, так что в области длин

волн более 230 нм можно наблюдать изменение спектральных характеристик именно ДНК в присутствии пептида.

Спектральными методами были исследованы комплексы пептида EDR с ДНК в растворе 5 мМ NaCl с добавлением 0,01 М Tris-HCl (рН=7). Концентрация ДНК была постоянной (0,004%), а концентрация пептида EDR варьировалась, что отражено в значении величины $r = C_{\text{AEDL}}/C_{\text{DNA}}$ (концентрация ДНК выражена в молях фосфатных групп).

На рис. 3.4, А (см. на вклейке) приведены спектры поглощения пептида, а на рис. 3.4, Б — спектры растворов ДНК с разными концентрациями пептида, которые демонстрируют влияние пептида на спектральные свойства ДНК.

На рис. 3.5, А (см. на вклейке) приведены спектры поглощения комплексов пептид-ДНК, а также построены суммы спектров поглощения свободных компонентов взаимодействия (пептида и ДНК). Видно, что сумма спектров не равна спектру комплексов, что говорит о связывании пептида с ДНК. На рис. 3.5, Б показаны спектры поглощения комплексов, нормированные на максимум полосы, из которых следует, что присутствие пептида в растворе ДНК приводит только к изменению амплитуды спектра без смещения максимума или трансформации формы полосы. Можно заметить, что ни батохромного, ни гипсохромного сдвигов максимума поглощения не наблюдается в данном диапазоне изменения концентрации пептида. Это может указывать на отсутствие прямых контактов пептида с основаниями ДНК при безусловном влиянии связывания на их стэкинг. Следует отметить, что возможные места связывания пептида с ДНК, по-видимому, насыщаются при $r > 1,5$, о чем свидетельствует ход изображенной на рис. 3.6, А (см. на вклейке) зависимости относительного изменения оптической плотности растворов при $\lambda = 260$ нм (в максимуме поглощения ДНК) от r .

Дестабилизация вторичной структуры молекулы ДНК может проявляться в спектрах поглощения вследствие нарушения стэкинг-взаимодействий и уменьшения стабильности водородных связей в комплементарных парах. Изучение спектров кругового дихроизма ДНК не выявило отличий при добавлении пептида в раствор (рис. 3.6, Б), что также свидетельствует в пользу отсутствия прямого контакта пептида EDR с основаниями ДНК.

Сравнение плавления свободной ДНК и ДНК в комплексе с пептидом EDR подтвердило высказанную выше точку зрения о том, что связывание пептида с ДНК сопровождается некоторой дестабилизацией вторичной структуры макромолекулы (рис. 3.7, А). При этом гиперхромный эффект при плавлении ДНК в комплексе ниже, так как при комнатной температуре уже фиксируется некоторое повы-

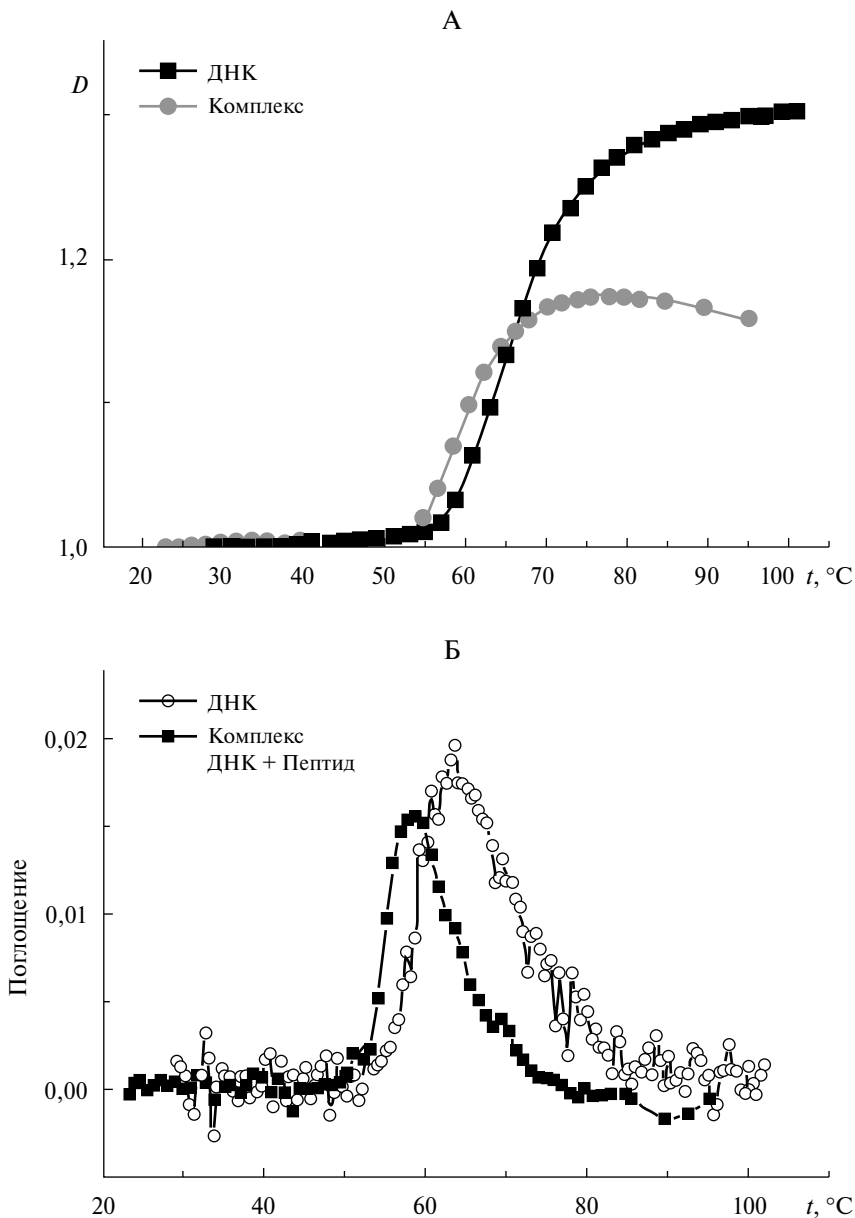


Рис. 3.7. Кривые плавления свободной ДНК и ДНК в комплексе с пептидом EDR в 0,005 М NaCl, $r = 3$, pH = 3 (А) и первые производные этих кривых (Б); D – оптическая плотность раствора

шение поглощения ДНК при связывании с пептидом. Температура плавления ДНК в комплексе с пептидом EDR снижается примерно на 4 градуса (рис. 3.7, Б).

Мы воспользовались двумя соединениями, которые связываются с ДНК по большой бороздке, вызывая характерные изменения в спектре поглощения ДНК (сами они в рассматриваемой спектральной области не поглощают). Первое соединение – соль CuCl_2 . В растворе соль диссоциирует. При добавлении в раствор ДНК ионы меди взаимодействуют как с фосфатными группами, так и с атомами N7 гуанина в большой бороздке макромолекулы. Именно связывание ионов меди в большой бороздке вызывает характерное изменение спектра поглощения ДНК – батохромный сдвиг полосы с небольшим уменьшением поглощения.

На рис. 3.8, А приведены данные по изучению конкурентного связывания пептида EDR и ионов меди с ДНК. Все системы содержали одинаковые концентрации компонентов. Отличие заключалось лишь в порядке добавления пептида EDR и ионов меди в раствор ДНК. Для большей уверенности в формировании комплексов второй компонент добавляли в раствор ДНК с первым веществом через сутки (растворы хранили при температуре 4 °С), а измерения проводили еще через сутки. Контрольные растворы хранили при тех же условиях и одинаковое время с испытуемыми системами. Для наглядности на рис. 3.8, Б приведены нормированные спектры поглощения ДНК, которые более ярко демонстрируют влияние присутствия ионов меди и цисплатина на процесс связывания пептида EDR с ДНК.

Из данных рис. 3.8, А следует, что индуцированные связыванием ионов меди спектральные изменения ДНК (батохромный сдвиг и гипохромный эффект) наблюдаются для всех систем за исключением систем с высоким содержанием Cu^{2+} ($r = 3$). В последнем случае нехарактерный для полосы поглощения ДНК гипсохромный сдвиг полосы может указывать на формирование комплексов ионов меди с пептидом EDR, спектр поглощения которого частично пересекается со спектром поглощения ДНК.

Как и следовало ожидать, порядок добавления компонентов взаимодействия не играет при этом роли. Для всех других систем связывание ионов меди с ДНК реализуется, что следует из анализа спектров. Отсюда можно заключить, что на связывание меди с N7 гуанина добавление пептида EDR в раствор ДНК практически не влияет. Либо связывание меди с ДНК более сильное, либо пептид EDR не стремится формировать комплекс с ДНК с участием N7 гуанина. Для разъяснения этого вопроса обратимся к данным, полученным с участием второго соединения – известного противоопухолевого

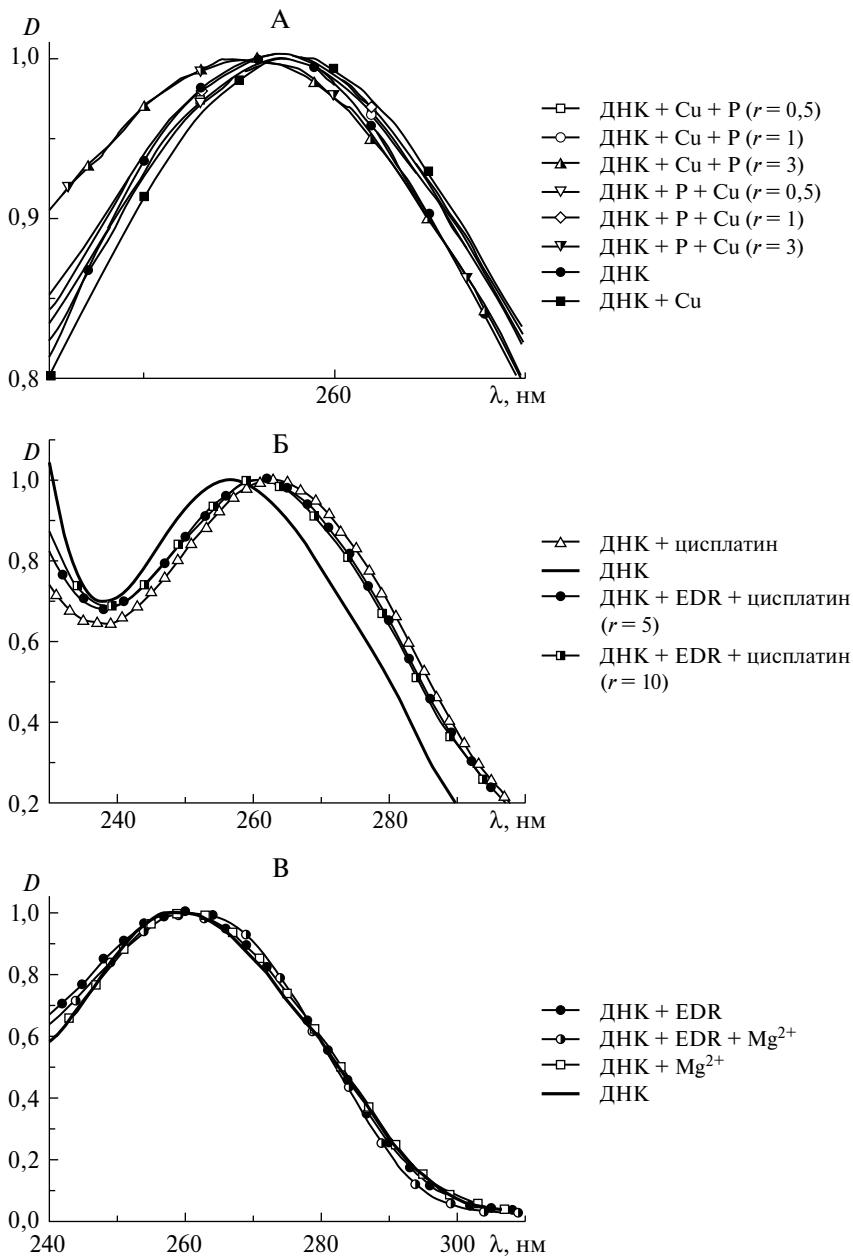


Рис. 3.8. Нормализованные спектры поглощения ДНК в комплексах с Cu (А), с цисплатином (Б), Mg^{2+} (В) в 5 мМ NaCl при добавлении пептида EDR до и после формирования этих комплексов. Величина r и порядок добавления пептида показаны на рисунках. $C(ДНК) = 0,002\% = 0,03 \text{ мМ(б.р.)}$, $C(Pt) = C(ДНК) = 0,045 \text{ мМ}$; D – оптическая плотность раствора, λ – длина волны

препарата цисплатина, который взаимодействует с молекулой ДНК в клетке с формированием координационной связи (рис. 3.8, Б).

При использовании цисплатина для всех систем наблюдается его связывание с ДНК с характерными спектральными изменениями на полосе поглощения ДНК (цисплатин в рассматриваемой области спектра не поглощает). Вместе с тем предварительное связывание пептида с ДНК приводит к небольшому сдвигу длинноволнового края полосы поглощения ДНК влево. Возможно, пептид EDR все же располагается (или частично располагается) в большой бороздке, стерически препятствуя цисплатину достигать N7 гуанина.

Известно, что взаимодействие цисплатина с ДНК протекает достаточно медленно, при этом формируется прочная координационная связь платины с N7 гуанина. Если в случае меди взаимодействие с N7 гуанина для большинства атомов протекает через воду, то цисплатин формирует связь таким образом, что атом азота замещает молекулу воды в координационной сфере платины. Сходство спектральных изменений ДНК при формировании комплексов меди и цисплатина с ДНК объясняется сходным возмущением электронной структуры основания в результате присоединения лиганда к N7 гуанина. Этот эксперимент показал также, что наблюдаемые в эксперименте с использованием ионов меди спектральные изменения (см. рис. 3.8, А) действительно не связаны только с взаимодействием Cu^{2+} -ДНК. Аналогичный эксперимент с использованием ионов двухвалентного магния (рис. 3.8, В), который не связывается с основаниями ДНК, а взаимодействует исключительно с фосфатными группами макромолекулы, показал, что в этом случае нет столь заметного изменения спектра поглощения ДНК, как при использовании ионов меди. Эксперимент с использованием ионов магния может указывать и на то, что даже если и есть взаимодействие пептида EDR с двухвалентными ионами металлов в растворе ДНК, оно не вносит принципиального вклада в обсуждаемые спектральные изменения ДНК в обсуждаемых тройных комплексах, причем чувствительными к присутствию пептида EDR оказываются комплексы, формируемые с участием азотистых оснований ДНК.

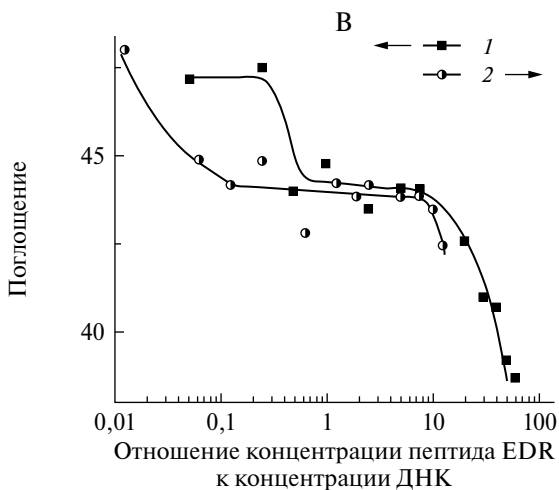
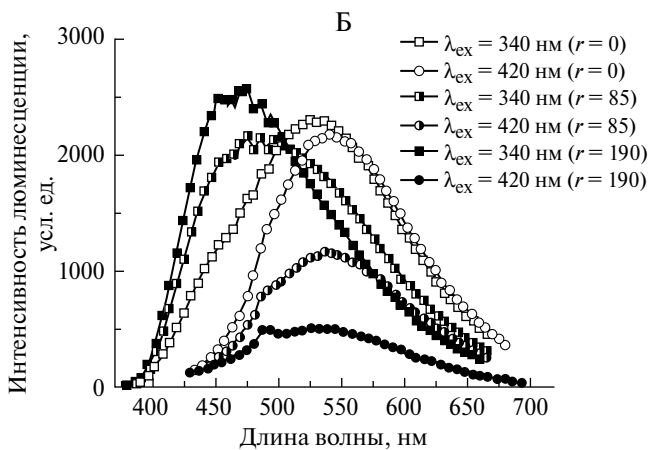
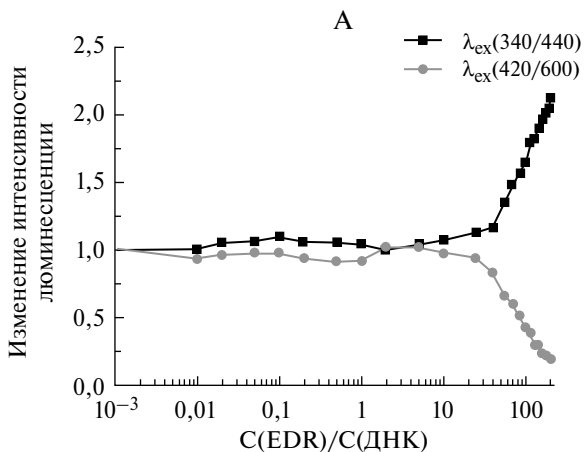
Подведем итог рассмотрения спектральных свойств ДНК при ее взаимодействии с пептидом EDR. Экспериментальные данные однозначно свидетельствуют о связывании пептида EDR, суммарный заряд которого равен -1 , с молекулой ДНК. Это связывание вызывает нарушение стэкинга оснований, что проявляется в появлении гиперхромного эффекта. При этом нет однозначного вывода о том, происходит ли непосредственный контакт атомных групп

пептида EDR с азотистыми основаниями ДНК, однако отмечается его слабое влияние на связывание ионов меди и цисплатина с N7 гуанина. Можно осторожно предположить, что пептид частично находится в большой бороздке ДНК и стерически частично препятствует этим соединениям достичь места связывания.

Воспользуемся возможностью проверить, присутствует ли пептид EDR в малой бороздке ДНК. Для этого мы провели изучение влияния разных концентраций пептида на флуоресценцию красителя DAPI в комплексах с ДНК. В нашем эксперименте соотношение концентраций DAPI и ДНК $\frac{C_{\text{DAPI}}}{C_{\text{ДНК}}}$ составляло 0,3.

На рис. 3.9, А представлена зависимость относительного изменения интенсивности люминесценции красителя для двух типов комплексов DAPI с ДНК. Как было показано ранее в наших экспериментах, при малых концентрациях красителя в растворе ДНК реализуется его сильное связывание с макромолекулой в малой бороздке, которое проявляется люминесценцией с максимумом при 440 нм ($\lambda_{\text{ex}} = 340$ нм), а с ростом концентрации DAPI начинает преобладать электростатическое взаимодействие с фосфатными группами ДНК, при этом в наших экспериментах фиксируется люминесценция при 600 нм ($\lambda_{\text{ex}} = 420$ нм). При отношении концентраций красителя и ДНК 0,3 вклад вносят оба типа связывания. Возможность различить эти типы, проводя измерение интенсивности при разных длинах волн, дает дополнительную информацию о связывании пептида EDR с ДНК. Действительно, добавляя пептид к комплексу ДНК с DAPI, можно видеть, что в широкой области концентраций пептида EDR интенсивность люминесценции не меняется, за исключением очень больших значений r (соотношение $r = C(\text{EDR})/C(\text{ДНК}) > 2$). Действительно, в спектрах люминесценции при возбуждении в максимуме поглощения ($\lambda_{\text{ex}} = 340$ нм) с увеличением r растет вклад люминесценции, отвечающей за сильное бороздочное связывание (максимум спектра сдвигается в коротковолновую сторону). При возбуждении на краю спектра поглощения (420 нм), где поглощает только электростатически связанный с ДНК краситель DAPI, форма спектров люминесценции не изменяется, только падает интенсивность.

Таким образом, добавление EDR к растворам, содержащим комплексы ДНК с DAPI, приводит к изменению соотношения поразному связанным с ДНК молекул DAPI: введение пептида EDR увеличивает долю красителя, связанного по малой бороздке (или существенно увеличивает квантовый выход люминесценции), и уменьшает долю связывания по фосфатам (или гасит люминесценцию такого красителя). Это указывает на отсутствие связывания пептида EDR в малой бороздке ДНК. Видно, что значительное



изменение интенсивностей наблюдается при r около 10. Причем, если интенсивность люминесценции, отражающей связывание красителя по малой бороздке ДНК, резко возрастает, то интенсивность люминесценции, связанной с электростатическими контактами DAPI с ДНК, так же резко падает (рис. 3.9, А). Таким образом, большой избыток пептида EDR в растворе ДНК препятствует формированию связывания красителя по фосфатам и способствует его фиксации в малой бороздке ДНК. При умеренных r связывание красителя практически не зависит от присутствия пептида EDR. Иными словами, в рассматриваемых системах пептида в малой бороздке ДНК нет.

Кратко остановимся на рассмотрении влияния пептида EDR на люминесценцию другого красителя — этидия бромида (EtBr). Известно, что квантовый выход люминесценции этого красителя существенно выше при его связывании с ДНК. Известно также, что этот краситель формирует комплекс с ДНК путем так называемого интеркаляционного связывания — плоские хромофоры красителя встраиваются между парами оснований. Второй распространенной моделью его связывания с ДНК является так называемое внешнее связывание. С увеличением концентрации красителя в растворе ДНК или при изменении ионной силы изменяется соотношение фракции внешне связанного и интеркалированного красителя. При этом для разных комплексов в связывании красителя с ДНК значительную роль играют и электростатические взаимодействия. Следует подчеркнуть, что при рассмотрении люминесценции этого красителя в комплексе с ДНК речь идет, главным образом, об интеркалированном красителе.

В наших экспериментах было показано, что при определенной концентрации пептида в растворе ДНК наблюдается тушение флуоресценции этидия бромида (EtBr). Мы использовали две концентрации красителя (их отношение к молярной концентрации пар оснований ДНК соответствует $z = 0,5$ и $z = 0,005$). При обеих концентрациях EtBr наблюдается тушение люминесценции при достаточно низкой концентрации пептида $r > 0,2$ (рис. 3.9, Б и В).

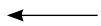


Рис. 3.9. Зависимость относительного изменения интенсивности люминесценции DAPI для двух типов его связывания с ДНК при добавлении пептида EDR (А). Здесь $\lambda_{ex}(340/440)$ соответствует сильному связыванию DAPI по малой бороздке ДНК (квадрат), $\lambda_{ex}(420/600)$ — более слабому электростатическому связыванию красителя с фосфатами макромолекулы (кружок). Б — спектры люминесценции DAPI при больших r . Пептид EDR добавляли к комплексу DAPI с ДНК. В — зависимость люминесценции красителя этидия бромида в растворе ДНК в 0,005 М NaCl от r . Кривая 1 относится к случаю $z = 0,5$; $C(EB) = 5 \times 10^{-6}$ М, $C(ДНК) = 5 \times 10^{-6}$ М; кривая 2 — к случаю $z = 0,005$; $C(EB) = 2 \times 10^{-7}$ М, $C(ДНК) = 4 \times 10^{-5}$ М

Резкое снижение люминесценции регистрировалось при $r > 10$ (рис. 3.9, В). При $z = 0,005$ уменьшение люминесценции EtBг начинается с существенно меньшего r (напомним, что это отношение молярных концентраций пептида и фосфатов ДНК). Так как EtBг в малых концентрациях интеркалирует между основаниями ДНК, а при высоких концентрациях красителя также реализуется и внешнее связывание с фосфатами ДНК, рассмотренные данные свидетельствуют об уменьшении люминесценции интеркалированного красителя. Пептид EDR частично вытесняет краситель. Можно полагать, что его связывание с ДНК несколько искажает геометрию двойной спирали.

При исследовании влияния пептида EDR на третичную структуру ДНК был использован метод низкоградиентной вискозиметрии. Для определения относительной вязкости растворов ДНК в работе использовали модифицированный низкоградиентный вискозиметр типа Зимма—Крозерса. Из полученных в эксперименте значений относительной вязкости растворов (ηr) рассчитывали значение удельной ($\eta r - 1$) и приведенной вязкости. При необходимости величину характеристической вязкости ДНК определяют путем экстраполяции к нулевой концентрации ДНК-зависимости приведенной вязкости от концентрации ДНК. Результаты показывают, что при добавлении пептида в раствор ДНК наблюдается уменьшение приведенной вязкости раствора в 0,005 М NaCl, что можно связать с уменьшением объема молекулярных клубков (рис. 3.10). Изменяется полиэлектролитное набухание ДНК, так как при большей концентрации соли, экранирующей заряды, изменения вязкости не наблюдается (рис. 3.10, А). Тем не менее, мы не можем исключить падения изгибной жесткости ДНК из-за дестабилизации ее вторичной структуры. В условиях же экранировки зарядов, по-видимому, взаимодействие ДНК с пептидом EDR затруднено. Заметим, что комплексы пептид-ДНК легко разрушаются, о чем свидетельствует отсутствие изменения электрофоретической подвижности ДНК при изучении гель-электрофореза (рис. 3.10, Б). Таким образом, присутствие пептида EDR в растворе ДНК оказывает влияние и на ее вторичную, и на ее третичную структуру.

Эти результаты согласуются с данными, полученными методом динамического светорассеяния с использованием установки Photo Cor.

Совокупность рассмотренных результатов комплексного исследования взаимодействия пептида с ДНК в растворе показывает, что пептид EDR взаимодействует с ДНК, оказывая дестабилизирующий эффект на вторичную структуру макромолекулы и ком-

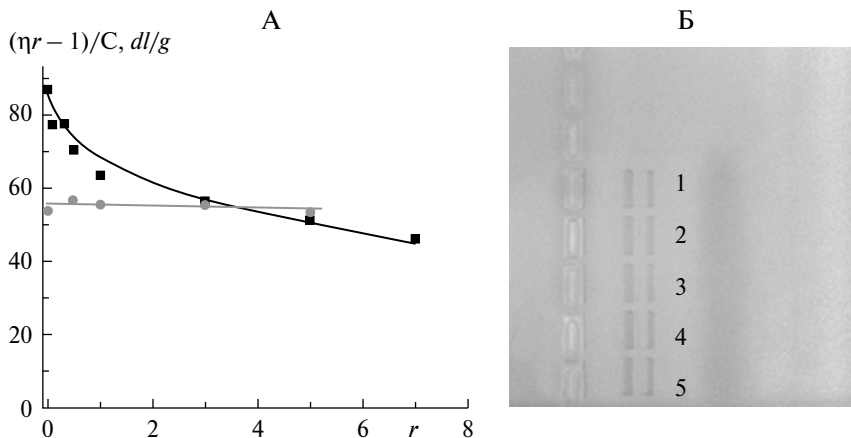


Рис. 3.10. Зависимость относительного изменения приведенной вязкости растворов ДНК с пептидом EDR в 0,005 М NaCl (квадрат) и 0,15 М NaCl (кружок) от r (А) и результат изучения электрофореза комплексов ДНК с пептидом при разных r (Б). Первая и пятая дорожки показывают результат для свободной плазмидной ДНК, дорожки 2–4 демонстрируют результат, полученный для $r=5$ (2), $r=15$ (3), $r=30$ (4)

пактизирующее влияние на объем ее молекулярного клубка. Таким образом, в случае контакта пептида EDR с молекулой ДНК в клетке возможно его влияние на функциональные и структурные свойства этой важнейшей биологической макромолекулы.

3.3. Исследование взаимодействия пептида EDR с ДНК *in silico*

Молекулярное моделирование позволяет построить химическую структуру коротких пептидов с использованием специальных компьютерных программ, в основу которых заложены базы данных о структурах и физико-химических свойствах атомов и некоторых макромолекул. Моделирование макромолекулы включает в себя подбор необходимых атомов или фрагментарных молекул из базы данных программы и построение межатомных связей согласно валентности.

Для молекулярного моделирования использовали специальную компьютерную программу для визуализации химического строения коротких пептидов и нахождения новых структурных изомеров. Расчет исследуемого короткого пептида проводили методом молекулярной механики с использованием силового поля MMFF94. После построения компьютерных моделей пептидов была проведена

геометрическая оптимизация их структур путем минимизации энергии. Минимизация энергии выполнялась методами скорейшего спуска и сопряженных градиентов. Заключительным этапом конформационного поиска была оценка физико-химических особенностей полученных конформеров пептидов, расчет длины пептидной цепи молекулы, дипольного момента, средней потенциальной энергии, а также измерение торсионных углов вращения. В связи с тем что в работе исследовались короткие пептиды, состоящие из трех аминокислотных остатков, измерялись только два торсионных угла. Количество найденных конформаций, а также анализ изменения торсионного угла в пептидах показывают, насколько молекулы стабильны или не стабильны в пространстве. Предполагалось, что наиболее энергетически выгодные стереоизомеры молекул являются биологически активными и именно в такой конформации несут свою биологическую функцию.

Построение молекулы двуцепочечной ДНК выполнялось в программе МОЕ2012.10. Учитывалась В-форма молекулы со стандартными большой (2,1 нм) и малой (1,1 нм) бороздками. К фосфатным группам добавлялись ионы натрия и хлора. После построения молекула протонировалась при условиях $\text{pH} = 7$ и $T = 300^\circ \text{K}$ и проводилась оптимизация геометрии в поле AMBER12ЕНТ. Расчеты проводились в водной среде. Влияние водной среды учитывалось в генерализованном борновском приближении с введением внутренней диэлектрической константы, равной 1, а внешней 80.

При расчете оптимальных ориентаций пептидов в двуцепочечной ДНК с помощью метода докинга учитывали площадь контакта, число водородных связей, параметры гидрофобных и электростатических взаимодействий. Решения докинга ранжировались по величинам оценочной функции. Далее проводили оптимизацию геометрии комплекса в каждом найденном решении докинга. Энергию связи рассчитывали, как разницу потенциальных энергий комплекса ДНК и пептида и изолированных молекул. Далее вычитали энтропийный вклад, который составлял 12 ккал/моль. Выраженность взаимодействия пептида с ДНК определяли величиной отрицательных значений ΔE : чем энергия более отрицательна, тем сильнее взаимодействие. Иными словами, взаимодействие было тем сильнее, чем более отрицательной была энергия.

После проведения анализа полученных данных докинга и значений оптимизации геометрии всех исследуемых последовательностей двуцепочечной ДНК подбирались наиболее энергетически выгодная последовательность нуклеотидов ДНК, соответствующая пептиду. Далее такая последовательность находилась в промоторных участках генов белков, являющихся мишенью для пептида.

Конформационный анализ пептида EDR

Молекула пептида EDR состоит из двух отрицательно заряженных аминокислотных остатков – глутаминовой и аспарагиновой кислот и положительно заряженного аргинина. Масса молекулы цвиттер-иона составляет 417,4 г/моль, суммарный заряд –1. Индекс гидрофобности –11,5 по таблице Кайта–Дуллита. Содержит 6 доноров и 8 акцепторов протона. В конформационном поиске использовался метод LowModeMD, который позволил найти 376 наиболее энергетически выгодных конформаций пептида EDR. На рис. 3.11 (см. на вклейке) показано совмещение первых 15 полученных конформаций.

Конформационный анализ пептида KED

Молекула пептида KED состоит из положительно заряженного лизина и двух отрицательно заряженных аминокислотных остатков глутаминовой и аспарагиновой кислот. Масса молекулы цвиттер-иона составляет 389,38 г/моль, суммарный заряд –1. Индекс гидрофобности –10,9 по таблице Кайта–Дуллита. Содержит 4 донора и 8 акцепторов протона. Были найдены 126 наиболее энергетически выгодных конформаций пептида. На рис. 3.12 (см. на вклейке) показано совмещение первых 15 полученных конформаций.

Сравнительный анализ конформаций пептидов KED и EDR

Методом конформационного анализа были рассчитаны наиболее энергетически выгодные конформации пептидов, которые они принимают в растворителе. Оказалось, что молекула пептида KED может принимать в 2 раза больше конформаций, чем пептид EDR. Это свидетельствует о том, что пептид KED является менее стабильной молекулой. Среднеквадратичное отклонение конформаций пептида KED при их сопоставлении составило 0,356 Å, а пептида EDR – 0,143 Å, что также указывает на конформационную стабильность пептида EDR в отличие от пептида KED. В табл. 3.1 приведены средние конформационные энергии пептидов KED и EDR.

Конформационная энергия молекулы пептида KED в силовом поле MMFF94x выше по модулю, чем у пептида EDR. Наиболее значимый вклад в энергию вносит электростатика: E_{ele} пептида

Таблица 3.1
Результат оценки гидродинамического радиуса молекулы ДНК при взаимодействии с пептидом EDR в 0,005 M NaCl

Пептид	Конформационные энергии пептидов								
	E_{tot}	E_{str}	E_{ang}	E_{stb}	E_{oop}	E_{tor}	E_{vdw}	E_{ele}	E_{sol}
KED, $n = 15$	$-532,7 \pm 0,45$	$8,12 \pm 0,29$	$16,29 \pm 1,72$	$0,97 \pm 0,15$	$0,40 \pm 0,21$	$2,97 \pm 0,52$	$34,19 \pm 1,22$	$-379,53 \pm 37,34$	$-216,16 \pm 39,22$
EDR, $n = 15$	$-352,9 \pm 0,65$	$6,04 \pm 0,06$	$12,57 \pm 0,29$	$1,00 \pm 0,04$	$0,43 \pm 0,03$	$4,78 \pm 0,58$	$32,01 \pm 0,19$	$-167,99 \pm 16,55$	$-241,80 \pm 16,51$

Примечание: E_{tot} – полная потенциальная энергия макромолекулы; E_{str} – энергия деформации связей; E_{ang} – энергия деформации валентных углов; E_{tor} – энергия деформации торсионных углов; E_{vdw} – энергия ван-дер-ваальсовых взаимодействий; E_{ele} – энергия электростатического взаимодействия; E_{sol} , E_{oop} , E_{str} , E_{stb} – добавочные энергии, учитывающие взаимодействие молекулы с растворителем.

KED составила $-379,5$ ккал/моль, а пептида EDR $-167,9$ ккал/моль. Такое отличие, скорее всего, связано с молекулой аргинина в пептиде KED, которая является более заряженной аминокислотой, по сравнению с лизином у пептида EDR.

При совмещении молекул пептидов KED и EDR показано, что их конформации значительно отличаются друг от друга (рис. 3.13, см. на вклейке).

Построена карта электростатического потенциала пептидов KED и EDR, согласно которой в молекуле KED заряд равномерно распределен по всей молекуле (рис. 3.14, А показан на вклейке), тогда как в молекуле EDR наблюдается разделение заряда, что придает ей выраженный дипольный момент (рис. 3.14, Б).

Поиск сайта связывания для пептида EDR в молекуле ДНК

Экспериментально показано, что пептиды EDR и KED увеличивают экспрессию следующих белков в культурах клеток крыс: виментина (VIM1), кальмодулина (CALM1) и 5-триптофангидроксилазу (TPH1). Установлено, что у спортсменов пептид EDR увеличивал экспрессию PPARA (рецептор, активирующий пролиферацию пероксисомы альфа), PPARG (рецептор, активирующий пролиферацию пероксисомы гамма), HSPA1A (ген белка теплового шока), синтез ферментов супероксиддисмутазы и глутатионпероксидазы. Вероятно, пептид участвует в регуляции экспрессии генов этих белков через связывание с сайтом, локализованным в промоторной области гена.

По принципу геометрической и электрохимической комплементарности двух правоспиральных молекул (пептида и ДНК) были подобраны предполагаемые сайты связывания для пептида EDR: d(CCTGCC) и d(CCAGC). Для построения сайта учитывались донорно-акцепторные связи между пептидом EDR и нуклеотидами ДНК и их пространственное расположение.

В промоторных участках генов TPH1, VIM1 и CALM1 были обнаружены предполагаемые сайты связывания для пептида EDR (табл. 3.2). В гене TPH1 найден один сайт связывания, в гене VIM1 – два сайта связывания, в гене CALM1 – один сайт связывания.

Анализ промоторных участков генов PPARA, PPARG, HSPA1A, SOD2 (mitochondrial) и GPX1 также указывает на наличие сайтов связывания для пептида EDR (табл. 3.3). Так, для гена PPARA обнаружено 3 предполагаемых сайта связывания, для гена

Таблица 3.2

Промоторные участки генов у крыс *Rattus norvegicus*

Ген	Регуляторный участок гена от -120 до 100 нуклеотидных пар (кДНК 5'→3')	GenBank №
TRH1	GCTTCTCCTATAAGAGGGGGCAGCTCCCGTCCGCAGGGTGACCCCT CTGAACSTCCAGTGGCTTGGAGTCTCTTCCAGTCCCGGATCC TGCCSACTGGGTCAITTCATTCAGATTCACCAATGATGAAAGAC AACAAGGAGAACAAAGACCAATCTCAGAAAGGGGGAGAGTG ACTCTCATCTTTCTCTTGAAGAATGAAGTTGGAGGACTCATAAA AG	X53501.1
VIM1	TCTTGTCTCTGGACCCSSCAGAGACCCAGCGGCTCCTACGGTTC ACAGCCACTGGCCCTCGCTCTCTTTCAGATCTTGCAGCCG CAGCAAAGCCAGGCCACCTCGTCTCTCGAAGCCATGTCCACCAGG TCCGTCTCTCGTCTCTCCTACCCGAGGATGTTCGGTGGCTCCGG CACATCGAGCCCGGCCAGCTCCAAACCCGGAGCTATGTGACCCACA T	BC061847.1
CALM1	ACAGGCCAGCAGCCTTGTCTCAGGTCCCGGACTCCCAAAGTGACC TCTGCCCGGTAATGAGCCCGCCGGCCGGCCCTTGGGG GCGGAGCCTTGGGTGAGGTCCGGTTGTCCAGGCCGCCCTGC GCGAGGCGGTACTGCCGGGGGAGGGATACCCGCGCACCCGTAT ATATATCGGGGCACACAGGGCTCGCCGTACGGCAGTGTGCTGG GAGT	D90396.1

Примечание: Жирным шрифтом и жирным шрифтом с чертой выделены предполагаемые сайты связывания для пептида EDR.

Промоторные гены участков человека *Homo sapiens*

Ген	Регуляторный участок гена от -499 до 100 нуклеотидных пар (кДНК 5' → 3')	GenBank №
PPARA	ACCGGCTCATCGCACAGAGTAGCAGAGCCGGGGTCCATCGAGGAGGCSAGGAG GGGCTCGCCAGCGTGGCACGGGGCCCGGGCGGGAACCTCCACCCCGCCCCG GGCCGGCGTCCCCCGCTCGAATTCAGCCCGCCCGGGTGGCCGGGCTGGA GGGCGGTGACGCTCAGCGGTGTCACATCGGTGACCTTGGACGGTCCCTCCA CCTCTCCGGCCTAGTTCCCTTGGCTGCAGCGGCCCGGGGGCCGTAGGTGG GAGCCGTGAGCGTCCCGGGGCCCGCCACCCGCGAGCAGCSAATCGGC GCGCCCTCCGGGGGTGTCTCCGGGGCCGAGCCCGGGCCCGGAGGGC GCGGGGGCGGGGGGCTTCCGGTCCGGGTCGGGCTCGGGACACTGGCTCGCGC GGACGGGGCAGGGGGCGGAGGGCGGTGCGTGTCTCGCGGGCGCGG GCTGGCACGGAGCGCGGAGGCCGCGCGGCAATGGCCGTGGACGGGCGG GCGCCGGGGGGCAGGGCGGGGGGGGGGAGGGGGCCGCTAGCGCG CCTGCCCGGGCGCCCTCTCGGCGTTCGGCCSACGG	NM_005036.4
PPARG	ACCAAGGACCCGAAATATGCTTTAATTAATTTCTTTTAAATGTCACCTGG AAAGAACATCTTGGGAAGACGGCTGGCCGATCGCGGTGTGAAGGGCAAGC CACTGTGCCGAGAGGCCACACCTGGGTCTCCACAGCCGGCCCTGG CCGGGGCATCCCCCTAAACTTCGGATCCCTCTCGGAAATGGACCCCTCTC TGGCCCGCTCCAGCGGTGGTGGCGAGAGCAACGACACCCAGTAGCCT GCGCGGGCAGAGTGGACCGCGGAAGCGGTGGTCTCCCGCGGTGGG CCTACTGTGGCGGGGGCCGAGCCGGCGCTCCCTCCAGTCGGCGC GCGCCGCCCGCCCGCCCGCCCGCCCGCCCGCCCGCCCGCCCGCCCGCCCGC CCACCCAGCGCGCCCGCCCGCCCGCCCGCCCGCCCGCCCGCCCGCCCGCCCGC CGACCCGGCTCCGCCGGGGCAGGGCGGGCCAGCGCACTCGGAGCCCGGAG CCCGAGCCGACCCCGCCCTGGGGCGCTTGGGTGGCCCTCGAGGACACCG GAGAGGGCGCCACGCCCGCCGTGGCCCGAGGT	NM_138712.3

Таблица 3.3 (продолжение)

Ген	Регуляторный участок гена от -499 до 100 нуклеотидных пар (кДНК 5'→3')	GenBank №
HSPA1A	<p>GTAATCTTTTCCAAACTGGCCCATGAGGTCAGAGACAGTATCTC CATTTGTAACGTGGCCGGGTGTCAACACAAACGCCCCACCCCT CCCTGGACGGCGTAACCCGCTCCCGCA<u>CCAGC</u>CCCCCTGCC ACAACCTGGCAGGCCAGAACCCCSACAATTAAAAGCCAGC GCCACCCTTCTGTCAATTAGGCGCTGAAGCGCAGCGGCTCAGC ATCGCATGGAGACCAACCCCTTCCACCGCCACTCCCTTCTCT CTCAGGTCCCTGTCCCTCCAGTGAATCCAGAAAGACTCTGGAG AGTTCTGACAGGGGGCGGCACTTGGCTCTGATTGGTCCAAAG AAGCTGGGGCAGGACGGGAGCGGAAACCCCTGGAATATTC CGACTGGCAGCTCATCGAGCTCGGTGATTGGCTCAGAAGGGAA AAGCGGGTCTCCGTACGACTTATAAAGCCAGGGGCAAGCG GTCCGGATAACGGTAGCCTGAGGAGCTGTCGCACAGTCCACTA CCTTTTTCGAGAGTGACTCCCGTTGTCCCAAGGCTTCCSAGAGCG AACCTGTGGGGCTGCAGG</p>	NM_005345.5
SOD2 (mitochondrial)	<p>GCTGGCGGGCTGACCAGCAGTAGGCCCCCGTCTTCCCTAGGA ACGGCACGGGGCCCTGGGAGGTATGAATGTCTTTTTCAGTG AGGCTCTGACCCCGGCCCCCGGACGGCAACCAAAACTCA GGGCAGCGCCGACCGCCTAGTCAGCCAGATCCCCGCCGG CACCTCAGGGGGAGCCGGAGGCGCCCTTCGGGCCGTACC AACTCCAGGGGACAGGGCCGCTCCCTTCGGCCCGGCCCACT CAAGTACGGCAGACAGGCAGGATTTGCCAGGCCGAGGCTAG CCTGAGCCTCTTCTCCCGTGCCTGGCGGGGTGTACGGC AAGCGGGGGGGGACAGGACACAGGCAACCCCGGGGT GGCGCGGGGGCGGGCGGGCCCGGGGGGGGGGGCG GGCGGGGTGCCCTGGCGCAGCTGGGTGGGGCCCTC CCCGCGTTTCTTAAGGCCCGGGGGCGGCGAGGCGGCACTCG TGGCTGTGGTCTCGGCAGGGCTTCAGCAGATCGGGCGCATC AGCGGTAGCAC<u>CCAGC</u>ACTAGCA</p>	NM_000636

Таблица 3.3 (окончание)

Ген	Регуляторный участок гена от -499 до 100 нуклеотидных пар (кДНК 5'→3')	GenBank №
GPXI	<p>GACTGTCCCGGTTAGAAAACCCGACGAGGGCGGTGCCGCTTT GGAGACAGGAGGGAGACCGGAAGCCTAGATCCCTCTGGC TGTCCCTGCACTGCCGTAACATGGACAGGAGAGGGGCTG TTTGTCAAGGGCAGCTCTGCAGCTGCTGCCGTCGCCACCCAG CCTCCTATGCCAAACCCACATCCTAАCTCAGGAACCTCTGAGA AAAAACGGAGCCCTCGAGGGCC<u>CCAGCCCT</u>TGGAAGGTAACC TGGACCGCTGCCGCTGGTTGCCCTGGGCCAGACCCAGACATGCCCT GCTGCTCCTCCGG CTTAGGAGGAGCACGCGTCCCGCTGGGCGCACCTCTCCAGCCCTT TTCCTGGCTGAGGAGGGCCGAGCCCTCCGGGTAGGGCGGGGG CCGGATGAGCGGGACCCCTCAGGCCCGAAACTGCTGTGCC ACGTACCCCGCCGCGCCAGTAAAGGAGGCGCCTGCTGGCC TCCCTTACAGTGTGTTCCGGGGCGCTCCGCTGGCTTCTGGAC AATTGGCCCATGTGCTGCTCGGCTAGCGGCGGGCGGGCGGGC GGCCSAGTCGGTGTATG</p>	NM_000581

Примечание: Жирным шрифтом и жирным шрифтом с чертой выделены предполагаемые сайты связывания для пептида EDR.

PPARG – 5 сайтов, для HSPA1A – 4 сайта, для SOD2 (mitochondrial) – 2 сайта, для GPX1 – 3 сайта связывания.

Моделирование молекулярных взаимодействий пептидов с дуплексом ДНК

В генах белков, экспрессия которых была увеличена под действием пептида EDR, обнаружены предполагаемые сайты связывания d(CCTGCC) и d(CCAGC). Представился интерес построить молекулярную модель взаимодействия пептида EDR с этими сайтами и оценить энергию взаимодействия данных комплексов. Так как пептиды KED и EDR одинаково оказывают действие на экспрессию белков, скорее всего, они связываются с одним и тем же сайтом в гене. Поэтому также рассчитывалась модель взаимодействия пептида KED с сайтами d(CCTGCC) и d(CCAGC).

Взаимодействие пептидов EDR и KED с последовательностью d(CCTGCC)

Была создана модель взаимодействия пептида EDR с дуплексом d(CCTGCC). Пептид EDR подставлялся в оптимизированную молекулу ДНК в предполагаемый сайт связывания, и проводилась оптимизация геометрии системы. Модель рассчитывалась с учетом растворителя и в поле AMBER12EHT. После проведения оптимизации геометрии был выполнен конформационный поиск методом LowModeMD. Комплекс пептид EDR + d(CCTGCC) не распался. Во всех комплексах пептид EDR взаимодействует с ДНК в большой бороздке с сайтом d(CCTGCC). На рис. 3.15 (см. на вклейке) представлен наиболее энергетически выгодный комплекс из 9 полученных конформаций.

Молекула пептида EDR образует сеть из 5 водородных связей с нуклеотидами ДНК в сайте d(CCTGCC). Атом кислорода карбоксильной группы глутаминовой кислоты взаимодействует с азотом N4 цитозина в положении DC51 (рис. 3.16–3.18 показаны на вклейке). Аминогруппа N-концевого участка пептида взаимодействует с атомом азота N7 аденина в положении DA10. Кислород основной цепи глутаминовой кислоты взаимодействует с N6 аденина DA10. Карбоксильная группа боковой цепи аспарагиновой кислоты образует водородную связь с аминогруппой N4 цитозина DC2, боковая цепь аргинина взаимодействует с N7 гуанина DG57.

Помимо водородных связей особое внимание следует уделить образованию π -катионных связей. Энергетический вклад одной π -катионной связи в водной среде составляет около 5 ккал/моль, что по сравнению с водородной связью (1,5 ккал/моль) вносит существенный вклад в энтальпию образования комплекса. В программном обеспечении МОЕ2012.10 такие связи не учитываются в расчетах энергии образования комплекса, однако отображаются в рабочем пространстве. Одна π -катионная связь найдена между положительно заряженным атомом азота аминокислотной группы основной цепи молекулы пептида EDR и пиримидиновым кольцом цитозина DC9 (рис. 3.17, см. на вклейке).

Вместо пептида EDR в сайт d(CCTGCC) был подставлен пептид KED и рассчитана энергия связи такого комплекса. Оказалось, что он энергетически более выгодный, чем комплекс с пептидом EDR (табл. 3.4). При взаимодействии пептида KED с сайтом d(CCTGCC) также была обнаружена сеть из 8 водородных связей (рис. 3.18, см. на вклейке). Однако π -катионных взаимодействий не найдено. Таким образом, с сайтом d(CCTGCC) наиболее энергетически выгодный комплекс образует молекула пептида KED.

Таблица 3.4

Энергии комплексов пептидов EDR и KED с предполагаемыми сайтами

Пептид	Предполагаемые сайты связывания	
	d(CCTGCC), E , ккал/моль	d(CCAGC), E , ккал/моль
KED	-17,2 (с π -кат. связью -22,2)	-19,8
EDR	-23,0	-4,8

Примечание: E – энергия связи, ккал/моль

Взаимодействие пептидов EDR и KED с последовательностью d(CCAGC)

На рис. 3.19 (см. на вклейке) представлена карта взаимодействия пептида EDR с сайтом d(CCAGC). Энергия взаимодействия такого комплекса составила -19,8 ккал/моль. Это указывает на то, что с сайтом d(CCAGC) пептид EDR образует энергетически более выгодный комплекс по сравнению с сайтом d(CCTGCC), где энергия взаимодействия составила -17,2 ккал/моль. Однако

если учитывать π -катионные взаимодействия, то комплекс с сайтом d(CCTGCC) также является энергетически выгодным.

При подстановке в сайт связывания пептида KED вместо пептида EDR энергия взаимодействия снизилась до $-4,5$ ккал/моль. Видно, что с нуклеотидами пептид KED образует всего 3 водородные связи, что указывает на такую низкую энергию взаимодействия (рис. 3.20, см. на вклейке).

Таким образом, были подобраны два предполагаемых сайта связывания для пептидов KED и EDR: $d(\text{CCTGCC})_2$ и $d(\text{CCAGC})_2$. С обоими сайтами пептиды образуют стабильные комплексы. Однако с сайтом $d(\text{CCAGC})_2$ пептид EDR взаимодействует с большей энергией, что указывает на образование энергетически более выгодного комплекса.

В промоторных участках генов TPH1, VIM1 и CALM1 были обнаружены предполагаемые сайты связывания для пептида EDR (табл. 3.2): в гене TPH1 – один сайт связывания, в гене VIM1 – два сайта связывания, в гене CALM1 – один сайт связывания.

Поскольку ранее было высказано предположение, что короткие пептиды способны проникать в клетку и эпигенетически регулировать экспрессию генов, нами были созданы сравнительные молекулярные модели взаимодействия пептидов KED и EDR с фрагментами промоторных зон генов, кодирующих изученные нами белки, и тех генов, повышение экспрессии которых наблюдалось под действием пептида EDR в ранее выполненных работах. При изучении конформационных особенностей пептидов KED и EDR было показано, что KED является более лабильной молекулой по сравнению с пептидом EDR и имеет более широкий спектр оптимальных значений энергии. В молекуле пептида KED заряд равномерно распределен по молекуле, тогда как в молекуле пептида EDR наблюдается четкое разделение заряда, что придает молекуле выраженный дипольный момент. Установлено, что пептиды KED и EDR способны связываться с большой бороздкой ДНК по последовательностям CCTGCC и CCAGC. При этом для пептида KED наиболее энергетически выгодный комплекс образуется с последовательностью CCAGC, а для пептида EDR – с последовательностью CCTGCC.

В промоторных участках генов TPH1 (ген триптофангидроксилазы – фермента, участвующего в синтезе серотонина), VIM1 (ген виментина) и CALM1 (ген кальмодулина) были обнаружены предполагаемые сайты связывания для пептида EDR. В генах TPH1 и CALM1 найден один сайт связывания, а в гене VIM1 – два сайта связывания. Анализ промоторных участков генов, кодирующих белки, регулирующие функциональную и антиоксидантную

активность клеток (PPARA, PPARG, HSPA1A, SOD2, GPX1), также указывает на наличие сайтов связывания для пептида EDR. Так, для генов PPARA и GPX1 обнаружено по 3 предполагаемых сайта связывания, для PPARG — 5 сайтов, для HSPA1A — 4 сайта связывания (см. табл. 3.3).

3.4. Исследование взаимодействия пептида EDR с гистоновыми белками *in silico*

Нуклеосома — это структурная часть хромосомы, образованная совместной упаковкой нити ДНК с гистоновыми белками H2a, H2b, H3 и H4. Гистоны являются компонентом нуклеосом, участвующих в упаковке хромосом. Нуклеосомы — фундаментальные структурные единицы хроматина. В формировании минимальной нуклеосомы участвуют гистоны H2a, H2b, H3 и H4. В одну нуклеосому входят по два коровых гистона каждого типа — всего восемь белков, вокруг них накручено 1,7 витка ДНК (рис. 3.21, см. на вклейке). Линкерный гистон H1, более крупный, чем коровые гистоны, связывается с ДНК в месте ее входа на нуклеосому. Гистон H1 расположен между нуклеосомными частями и участвует в компактизации 10 нм фибриллы в 30 нм.

Коровые гистоны H2b, H3 и H4 — это белки с массой, не превышающей 15 кДа, очень богаты остатками аминокислот лизина и аргинина, вследствие чего коровые гистоны имеют суммарный положительный заряд. Положительно заряженные аминокислотные остатки сосредоточены в С- и N-концевых участках молекул коровых гистонов, а в центральном домене находятся остатки гидрофобных аминокислот. N-концевые участки не имеют выраженной вторичной структуры, и называются «хвосты». В составе нуклеосом хвосты экспонированы вне коровой частицы и часто являются мишенью для действия ферментов, модифицирующих гистоны.

Участок ДНК, соединяющий соседние нуклеосомы и непосредственно не контактирующий с гистоновым октамером, взаимодействует с линкерным гистоном H1. Линкерный гистон H1 в основном располагается на небольшом участке ДНК переменной длины между нуклеосомами.

Гистон H1 имеют массу более 20 кДа и обогащен остатками лизина. В С-конце сосредоточены положительно заряженные аминокислотные остатки. Центральная часть N-концевого домена представлена гидрофобными аминокислотными остатками и способна в растворе образовывать глобулярную структуру. Линкер-

ный гистон обладает наибольшей гетерогенностью. Множественность форм характерна для гистонов класса Н1 млекопитающих. Белки Н1 играют непосредственную роль в стабилизации нуклеосом и хроматиновых структур и могут функционировать как общие или специфические репрессоры транскрипции, ограничивая доступ активаторам транскрипции к хроматину. Таким образом, модификация связывания гистона Н1 с нуклеосомой может быть необходимой ступенью в активации многих генов (рис. 3.22, см. на вклейке).

ДНК и нуклеосомные гистоны прочно соединены: в каждой нуклеосоме между ДНК и гистонами, входящими в ее состав, образуется 142 водородные связи. Почти половина этих связей возникает между основной цепью аминокислот гистонов и фосфодиэфирными группами сахарофосфатного остова ДНК. Помимо водородных связей ДНК с белками нуклеосомы скрепляют многочисленные гидрофобные взаимодействия и солевые мостики.

Результатом взаимодействия ДНК с гистонами является ее компактизация. В менее компактизованном эухроматине локализованы активно экспрессирующиеся гены. Гетерохроматинизацию связывают с подавлением экспрессии генов. У высших эукариот значительная часть хроматина находится в недоступном для экспрессии состоянии. Гетерохроматиновые области (прицентромерные области хромосом, ядрышковый организатор и области теломер) остаются конденсированными при прохождении через клеточный цикл. Эти участки конститутивного гетерохроматина включают повторяющиеся последовательности ДНК и незначительное число активных генов.

Гистоны являются консервативными структурами, однако ковалентные модификации «хвостовых» доменов приводят к возникновению регуляторных контактов с ДНК. Исследования методом масс-спектрометрии выявили значительное число модификаций гистонов, локализованных в коровой частице гистонового октамера. Гистоновый октамер связывает сахарофосфатный остов ДНК в 14 точках суперспирали, образуя более 100 атомных взаимодействий, азотистые основания нуклеотидов в этих взаимодействиях не участвуют. Модифицированные остатки на внешней поверхности кора нуклеосомы (фосфорилированный серин и треонин, метилированные лизин и аргинин и ацетилованный лизин) образуют тропинку для накручивания ДНК вокруг гистонового октамера. Некоторые из этих модификаций участвуют во взаимодействии с ДНК, что может прямо модулировать ДНК-гистоновые взаимодействия.

Гистоновые хвосты являются местом разнообразных посттрансляционных модификаций, они предопределяют взаимодействия гистонов с другими белками, которые, в свою очередь, могут контролировать структуру хроматина.

Тип модификации гистонов может влиять на структурную динамику нуклеосомы, изменяя таким образом доступность к ДНК. Ацетилирование гистонов ослабляет межнуклеосомное взаимодействие, а также взаимодействие нуклеосомы с линкерной ДНК, что приводит к большей доступности ДНК. Модификации гистонов создают дополнительный уровень регуляции экспрессии генов.

С помощью тушения флуоресценции показано, что Пинеалон связывался с FITC-мечеными гистонами пшеницы H1, H2b, H3 и H4. С самыми низкими константами связывался гистон H4. Сравнительный анализ известных аминокислотных последовательностей не выявил гомологичные мотивы в коровых гистонах, которые могли бы быть ответственными за связывание гистонов с пептидами. Однако сравнительный анализ первичных структур N-концов подфракций гистона H1 (место присоединения флуоресцентного зонда) выявил положительно заряженный сайт Lys-Ala-Ala-Lys-Ala-Lys-Lys, который имелся во всех изученных подфракциях гистона H1. Были также рассмотрены последовательности, образованные из комбинации этих аминокислот: Lys-Ala-Ala и Lys-Ala-Lys-Lys. В подфракции гистона H1 – H1.1 эти последовательности были найдены в следующих позициях: Lys42-Ala43-Ala44-Lys45-Ala46-Lys47-Lys48, в гистоне H1.3 – Lys34-Ala35-Ala36-Lys37-Ala38-Lys39-Lys40, в гистоне H1.6 – Lys24-Ala25-Ala26-Lys27-Ala28-Lys29-Lys30.

Вариант Lys-Ala-Ala и Thr-Gly-Gly был обнаружен в гистоне H3. В последовательности гистона H4 была выявлена последовательность Lys-Gly-Gly.

В гистоне H3 эти последовательности были найдены в следующих позициях: Thr11-Gly12-Gly13, Lys23-Ala24-Ala25, Thr32-Thr33-Thr34. В гистоне H4 – Lys5-Gly6-Gly7, Lys12-Gly13-Gly14.

Предполагается, что для пептидов, содержащих остатки лизина и аргинина, в том числе и для пептида EDR, связующим мотивом может быть более отрицательно заряженный сайт. Был обнаружен такой гомологичный сайт Glu-Val-Ala-Ala во всех подфракциях гистона H1. В гистоне H1.1 эта последовательность была найдена в позиции Glu13-Val14-Ala15-Ala16, в гистоне H1.3 – Glu4-Val5-Ala6-Ala7, в гистоне H1.6 – Glu6-Val7-Ala8-Ala9.

**Анализ последовательностей гистонов
и создание гомологичных моделей**

Для построения компьютерной модели взаимодействия пептидов с гистонами пшеницы необходимо создать их гомологичные модели, так как ранее не были расшифрованы пространственные структуры гистонов. Для создания таких моделей для гистонов H1, H2b, H3 и H4 были соответственно использованы структуры гистонов из базы данных белковых структур (Protein Data Bank, PDB) 5NL0, цепь Z; 1KX5, цепь A и цепь H; 1EQZ, цепь D.

В табл. 3.5 представлены последовательности гистонов пшеницы и соответствующие им последовательности расшифрованных гистонов из базы данных PDB. Идентичность последовательностей рассчитывалась с помощью программы BLASTp.

Таблица 3.5

Аминокислотные последовательности гистонов

Аминокислотная последовательность гистонов пшеницы <i>Triticum aestivum</i> , FASTA	Структура PDB и ее аминокислотная последовательность, использованная для построения гомологичных моделей гистонов, FASTA	Идентичность исходной последовательности и шаблона
<p>>H1.1</p> <p>MSTDWADVPAPEVAAAADPVVET ТАЕРАAGDANAАКЕТСАКААКАК KPSAPRKPRAAРАНПТЯЕМVSEA ITALKERTGSSPYAIAKFATDKHK AHLPAEFRKILSYQLKKLYASGK LTKVKASYKLSAAAАКPKPAAАКК КРАААККАРАККАТКАЖАКАРА KKSAAJKPKAKAKAKTКАААКPKA ААКPKAKAKAKЖАААКPKAAАК PKGPPAKAAKTSAKDAPGKNAGAA APKKRAAIKPPЖКЗТРУККААРА ККААРАJKКАРААККАКК</p>	<p>>5NL0, цепь Z</p> <p>HPKYSDMILAAVQAEKSRSGSSR QSIQKYIKNHYKYGENADSQIKL SIKRLVTSGALKQTKGVGASGSF RLAK</p>	<p>34%</p>
<p>>H1.3</p> <p>MSTEVAAAADIPVPQVEVAADAАVD ТРААНАКАРКААКАККSTGPKKPR VTPAHPSYAEEMVSEIAIAAJLKERSG SSTLVIGKFXEDKHKHAHLPAEFRKI LLTQIKKLVAAGKLTКVKGSYKL AKAPAAVKPKTATKКKPAАКPKA КАРАККАТААКSPAKKAAАКPKAK APAKAKAVAKPKAAАКPKAAАКP КАКАААКАРАААТPKKPAARKPP TKRATPVKКАAPAKKPAАККАКК</p>	<p>>5NL0, цепь Z</p> <p>HPKYSDMILAAVQAEKSRSGSSR QSIQKYIKNHYKYGENADSQIKL SIKRLATSGALKQTKGVGASGSF RLAK</p>	<p>36%</p>

Таблица 3.5

Аминокислотная последовательность гистонов пшеницы <i>Triticum aestivum</i> , FASTA	Структура PDB и ее аминокислотная последовательность, использованная для построения гомологичных моделей гистонов, FASTA	Идентичность исходной последовательности и шаблона
<p>>H3</p> <p>ARTKQTARKSTGGKAPRKQLATK AARKSAPATGGVKKPHRERPGTV ALREIRKYQKSTELLIRKLPFQRL VREIAQDFKTDLRFQSSAVAAJLQE AAEAYLVGLFEDTNLCAIHAKRVT IMPKDIQLARRIRGERA</p>	<p>>1KX5, цепь A</p> <p>ARTKQTARKSTGGKAPRKQLAT KAARKSAPAT GGYKKPHRYRPG TYALREIRRYQKSTELLIRKLPFQ RLYREIAQDFKTDLRFQSSAYMA LQEASEAYLVALFEDTNLCAIHA KRVTIMPKDIQLARRIRGERA</p>	96%
<p>>H4</p> <p>SGRGKGGKGLGKGGAKRHRKVLRL DMQGITKPAXRRLLARRGGMKRISG LIYEETRGTATKIFLENVIRDAVYTY EHARRKTVTAXDVVYALKRQGRT LYGFGG</p>	<p>>1EQZ, цепь D</p> <p>GAKRHRKYXRDNIQGITKPAIRRLA RRGVKCRISGLIYEETRGVLKVFL NVIRDAYTYTEHAKRKTVTAMDV VYALKRQGRTL YGFGG</p>	97%
<p>>H1.6</p> <p>PVPQVEVAADAAVDTPAASAKAPK AAKAKKSTGPKKPRVTPAHPSYAE MVSEAI AALKERSGSSTIAIAKFTED KHKAHL PANFRKILLTQIKKLVAA GKLTMMKGSYKLAKAPAAVKPKT ATKCKKPAAKPKAKAPAKKTAAKSP AKKAAAKPKAKAPAKAKAVAKPKA ASKPKAAAKPKAKAAAKKAPAAAT PKJKPAAARKPPTKRATPVKKAAPAK KPAAKKAKK</p>	<p>>5NL0, цепь Z</p> <p>HPKYSADADLAAVQAEKSRSGSSR QSIQKYDKXHYKVENADSQIKL SIKRLVTSGALKQTKGVGASGSF RLAK</p>	36%
<p>>H2b</p> <p>MAPKAAK KPAACKPAEEPAEKA EKTPAGKKPKAERRIPAGKSAKA GGDKKGGKKAKKSVETYKKYIFK ATOQATEPDIGISSKAMSXAESSFINDI FEKLAGEAAKIARYXKKPYITSREI QTSVRLMJPGELAKHAVSEGTKA VTKFTSAS</p>	<p>>1KX5, цепь H</p> <p>PEPAKSAPAPKKGSKKAVTKTQK KDGKRRRTRKESYAIIVYKYL KQATEPDTGISSKAMSIMNSFVND MFERIAGEASRLAHYXKRSTITSR EIQTAVRLLLPGELAKHAVSEG TAVTKYTSK</p>	65%

Для построения моделей гистонов использовали метод гомологичного моделирования, который позволял оценивать степень гомологии первичной структуры исследуемых белков с трехмерными структурами из белковой базы данных PDB, которые расшифрованы методами рентгеноструктурного анализа или ядерно-магнитного резонанса.

По методу Эдельсбрунера находили активные сайты связывания для пептидов в молекулах гистонов. Метод основан на поиске

наиболее энергетически предпочтительных областей для связывания пептида, которые в структуре гистона выделены альфа-сферами. С помощью этого метода определялись регионы жесткой атомной упаковки; не учитывались сайты, которые «слишком подвержены» растворителю (сайты, находящиеся на поверхности молекулы). Найденные сайты ранжировались по склонности к лигандному связыванию (PLB), которая основана на аминокислотном составе кармана.

Использовали «полугибкий» докинг, где учитывали конформационную подвижность только пептида, а боковые группы гистонов были жесткими. При расчете оптимальных ориентаций пептидов в гистон учитывали площадь контакта, число водородных связей, параметры гидрофобных и электростатических взаимодействий. Использовали силовое поле AMBER12ЕНТ и генетический алгоритм поиска GBVI/WSA.

Был осуществлен поиск кристаллических структур гистонов пшеницы Н1.1, Н1.3, Н1.6, Н2b, Н3, Н4 в общедоступной базе данных по белковым структурам (The Protein Data Bank). Для гистонов пшеницы таких данных найдено не было, в связи с чем были созданы гомологичные модели гистонов на основании существующих структур, имеющих высокую идентичность к аминокислотным последовательностям гистонов пшеницы Н1.1, Н1.3, Н1.6, Н2b, Н3, Н4 (>30% идентичности).

Конформационный поиск пептида EDR описан в разделе 3.3. Для построения моделей гистонов использовали метод гомологичного моделирования, который позволял оценивать степень гомологии первичной структуры исследуемых белков с трехмерными структурами из белковой базы данных PDB. Для создания моделей гистонов Н4, Н3, Н2b, Н1.1, Н1.3, Н1.6 использовали расшифрованные рентгеноструктурным анализом атомистические структуры гистонов (PDB code: 1EQZ, цепь D; 1KX5, цепь А и Н; 5NL0, цепь Z). В табл. 3.5 показаны участки, используемые для построения гомологичных моделей гистонов.

Взаимодействие пептида EDR с гистоном Н4

Гомологичная модель гистона Н4 пшеницы *Triticum aestivum* была построена с использованием структуры 1EQZ цепи D. На рис. 3.23 представлено выравнивание первичной последовательности гистона Н4 с последовательностью расшифрованных участков гистона (PDB code: 1EQZ, цепь D). Идентичность участков составила 97%. Покрытие последовательности составило 87%.

```

1EQZ_D -----GAKRHRKVLRDNIQGITKPAIRRLARRGGVKRISGLIYEETRGVLKV
H4      SGRGKGGKGLGKGGAKRHRKVLRDNIQGITKPAIRRLARRGGVKRISGLIYEETRGVLKI
          *****
1EQZ_D  FLENVIRDAVITYTEHAK-KTVTAMDVVYALKRQGRTLYGFGG
H4      FLENVIRDAVITYTEHARRKTVTANDVVYALKRQGRTLYGFGG
          *****

```

Рис. 3.23. Выравнивание первичной последовательности белка гистона H4 с использованием структуры 1EQZ, цепь D, и гистона пшеницы H4; * – идентичные последовательности; : – высоко консервативные последовательности гистонов

С помощью программного пакета MOE Homology Modeling построена модель гистона H4 с заданной первичной последовательностью (см. рис. 3.23). Третичная структура гистона H4, используемого для построения гомологичной модели гистона с заданной последовательностью, состоит из 4 альфа-спиралей, образованных 50 аминокислотными остатками, 4 петлями (8 а.о); N-терминальным участком (14 а.о) и C-терминальным участком (9 а.о). N-терминальный конец выступает за пределы октамера и может служить мишенью для эпигенетической регуляции и связывания с различными лигандами.

На рис. 3.24 (см. на вклейке) изображен сайт связывания для лигандов, определенный методом Эдельзбрунера. Он локализован в N-терминальном конце и образован аминокислотными остатками Gly14-Ala15-Lys16-Arg17-His18-Arg19-Lys-20-Val21-Leu22-Arg23-Asp24-Asn25-Ile26-Gln27. По этому сайту был проведен докинг исследуемого пептида. С гистоном H4 пептид EDR в основном образует сеть водородных связей с остатками, образующими мотивы Gly14-Ala15-Lys16 и Leu22-Arg23, Asn25. Наилучшее решение докинга для связывания пептида EDR с гистоном H4 по N-терминальному концу соответствует энергии $-6,97$ ккал/моль (рис. 3.25, см. на вклейке).

Гомологичная модель гистона H3 пшеницы *Triticum aestivum* была построена с использованием структуры 1KX5, цепь A. На рис. 3.26 представлено выравнивание первичной последовательности гистона H3 с последовательностью расшифрованных участков гистона (PDB code: 1KX5, цепь A). Идентичность участков составила 96%. Покрытие последовательности составило 100%.

С помощью MOE Homology Modeling построена модель гистона H3 с заданной первичной последовательностью (рис. 3.27, см. на вклейке). Структура гистона H3, используемого для построения гомологичной модели гистона с заданной последовательностью, состоит из 4 альфа-спиралей, образованных 66 а.о, и 2 бета-листов, образованных 4 а.о, длинным N-терминальным участком (42 а.о)

```

1KX5_A  ARTKQTARKSTGGKAPRKQLATKAARKSAPATGGVKKPHRYRPGTVALREIRRYQKSTEL
H3      ARTKQTARKSTGGKAPRKQLATKAARKSAPATGGVKKPHRERPGTVALREIRKYQKSTEL
          *****;*****

1KX5_A  LIRKLPFQRLVREIAQDFKTDLRFQSSAVMALQEASEAYLVLFEDTNLCAIHAKRVTIM
H3      LIRKLPFQRLVREIAQDFKTDLRFQSSAVAALQEAAEAYLVGLFEDTNLCAIHAKRVTIM
          *****;*****.*****

1KX5_A  PKDIQLARRIRGERA
H3      PKDIQLARRIRGERA
          *****

```

Рис. 3.26. Выравнивание первичной последовательности белка гистона 1KX5, цепь А, и гистона пшеницы H3; * – идентичные последовательности; : – высокогомологичные последовательности

и коротким С-терминальным участком (5 а.о). Длинный N-терминальный конец выступает за пределы октамера и может служить мишенью для эпигенетической регуляции и связывания с различными лигандами.

В N-терминальном хвосте были определены 4 предполагаемых сайта связывания для лигандов: сайт 1, образованный аминокислотами Ser28-Ala29-Gly34-Val35-Lys36-Lys37-Pro38-His39; сайт 2, образованный Lys23-Ala24-Ala25-Arg26-Ser28-Ala29-Pro30; сайт 3, образованный Lys14-Pro16-Arg17-Lys17-Lys18-Gln19-Leu20-Ala21-Thr22; сайт 4, образованный Arg2-Thr3-Lys4-Thr6-Ala7-Arg8-Lys9. По этим сайтам был проведен докинг с пептидом EDR. Оказалось, что пептид EDR образует сеть водородных связей с участком, образованным а.о Arg8-Lys9, Arg17, Arg26-Lys27, Ala31. Наилучшее решение докинга для связывания пептида EDR с гистоном H3 по N-терминальному концу соответствует энергии –6,17 ккал/моль (рис. 3.28, см. на вклейке).

Гомологичная модель гистона H2b пшеницы *Triticum aestivum* была построена с использованием структуры 1KX5 цепи H. На рис. 3.29 представлено выравнивание первичной последовательности гистона H2b с последовательностью расшифрованных участков гистона (PDB code: 1KX5, цепь H). Идентичность участков составила 65%. Покрытие последовательности составило 79%.

С помощью МОЕ Homology Modeling построена модель гистона H2b с заданной первичной последовательностью с использованием структуры 1KX5, цепь H (рис. 3.30, А показан на вклейке). Третичная структура гистона H2b, используемого для построения гомологичной модели гистона с заданной последовательностью, состоит из 4 альфа-спиралей, образованных 69 а.о, и 2 бета-листов, образованных 4 а.о, длинным N-терминальным участком (41 а.о) и коротким С-терминальным участком (3 а.о). На рис. 3.30, Б изображены 3 сайта связывания для лигандов, определенных мето-

```

1KX5_H -----AKSAPAPKK-----GSKKAVTKTQKKGDKKRRRK
H2b      MAPKAAKKPAAKKPAEEEPAAEKAEKTPAGKKPKAERRIPAGKSAAKAGGDKKGGKKAKK
          *.:.* **          ..*.*.   .*.*: *

1KX5_H  RKESYAIYVYKVLKQVHPDTGISSKAMSIMNSFVNDVFERIAGEASRLAHYNKRSTITSR
H2b     SVETYYKYIFKVIKQVHPDIGISSKAMSIMNSFINDIFEKLAGEAAKIARYNKKPYITSR
          *:*  *::**:* ** *:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*

1KX5_H  EIQTAVRLLLPGELAKHAVSEGTKAVTKYTSAK
H2b     EIQTSVRLVLPGELAKHAVSEGTKAVTKFTSAS
          *:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*

```

Рис. 3.29. Выравнивание первичной последовательности белка гистона 1KX5, цепь H, и гистона пшеницы H2b; * – идентичные последовательности; : – высокогомологичные последовательности

дом Эдельзбрунера. Они локализованы в N-терминальном конце и образованы следующими аминокислотными остатками: сайт 1 – Thr27-Pro28-Ala29-Gly30-Lys31-Gly42-Lys43; сайт 2 – Ser44-Ala45-Ala46-Lys47-Ala48-Lys53; сайт 3 – Ala29-Gly30-Pro40-Gly42-Lys43-Ser44. По этим сайтам был проведен докинг пептида EDR.

Оказалось, что пептид EDR связывается с гистоном H2b по сайту 3. Наилучшее решение докинга для связывания пептида EDR с гистоном H2b по N-терминальному концу соответствует энергии –6,57 ккал/моль (рис. 3.31, см. на вклейке).

Гомологичная модель линкерных гистонов H1.1, H1.3 и H1.6 пшеницы *Triticum aestivum* была построена с использованием структуры 5NL0, цепь Z. На рис. 3.32 представлено выравнивание первичных последовательностей гистонов пшеницы H1.1, H1.3 и H1.6 с последовательностью расшифрованного участка линкерного гистона H1 (PDB code: 5NL0, цепь Z). Идентичность участка составила ~35%. Покрытие последовательностей составило ~30%. В структуре 5NL0 не были расшифрованы N- и C-концевые участки белка.

С помощью программного пакета MOE Homology Modeling построена модель гистона H1 с заданной первичной последовательностью (рис. 3.33, см. на вклейке). Третичная структура гистона H1, используемого для построения гомологичной модели гистона с заданной последовательностью, состоит из 3 альфа-спиралей, образованных 37 аминокислотными остатками, и 3 бета-листов, образованных 13 аминокислотными остатками. N- и C-концевые участки в структуре отсутствуют, поэтому для докинга пептидов выбирались сайты связывания с ДНК. На рис. 3.33 (см. на вклейке) также изображены сайты связывания для лигандов, определенные методом Эдельзбрунера.

```

5NL0_Z -----
H1.6 -----PVPQVEVAADAADVTPA-----ASAKAPKAAKAKKSTGPKKPRVTP
H1.3 MSTEVAAADIPVPQVEVAADAADVTPA-----ANAKAPKAAKAKKSTGPKKPRVTP
H1.1 MSTDV-VADVPAPEVAAADPVVETTAEPAAGDANAAKETKAKAAKAKKPSAPRKPRAAP

5NL0_Z -HPKYSDMI LAAVQAEKSRSGSSRQSIQYIKNHVYKGE--NADSIKLSIKRLVTSGL
H1.6 AHPSYAEMVSEIAALKERSGSSTIAIAKFIEDKHKAHL PANFRKILLTQIKKLVAAAGKL
H1.3 AHPSYAEMVSEIAALKERSGSSTIAIGKFIEDKHKAHL PANFRKILLTQIKKLVAAAGKL
H1.1 AHPTYAEMVSEAITALKERTGSSPYAIAKFVEDKHKAHL PANFRKILSVLQKLVASGKL
  **.*::*: * * *.*:** * *:::***. * . : .:***:* *

5NL0_Z KQTKGVGASGSFRLAK-----
H1.6 TKVKG-----SYKLAKAPAAVKPKTATKKKPAAPK-----AKAPAKKTAAKSPAKKAAAKPK
H1.3 TKVKG-----SYKLAKAPAAVKPKTATKKKPAAPK-----AKAPAKKTAAKSPAKKAAAKPK
H1.1 TKVKA-----SYKLSAAAAPK-----AAKKKPAAKKAPAKKTATKTAKAPAKKSAAPK
  .:.*. *::*:

5NL0_Z -----
H1.6 AKAPAKAKAVAKPKAASKPKAAAKPKAKAA-----AK-----KAPA
H1.3 AKAPAKAKAVAKPKAAAKPKAAAKPKAKAA-----AK-----KAPA
H1.1 AKAPAKTAAAKPKAAAKPKAKAPAKTAAAKPKAAAKPKGPPAKAAKTSKADPAGKNAG

5NL0_Z -----
H1.6 AATPKKPAARKPPTKRATPVKKAAPAKKPAAKKA-----KK
H1.3 AATPKKPA-ARKPPTKRATPVKKAAPAKKPAAKKA-----KK
H1.1 AAAPKK-PAARKPPTKRSTPVKKAAPAKKAAAPAKKAPAAPAKK

```

Рис. 3.32. Выравнивание первичной последовательности белка гистона 5NL0, цепь Z, и гистонов пшеницы H1.1, H1.3, H1.6; * – идентичные последовательности; : – высокогомологичные последовательности

Сайты связывания в гистоне H1.6 образованы следующими аминокислотными остатками: сайт 1 – Ile66-Ala69-Lys70-Glu73-Asn83-Ile87; сайт 2 – Leu57-Ala67-Lys70-Phe71-Asp74-Lys75; сайт 3 – Ser51-Ile54-Ala55-Leu57-Lys58-Glu59-Gly62-Pro114-Ala115.

Сайты связывания в гистоне H1.3 образованы следующими аминокислотными остатками: сайт 1 – Lys103-Val106-Tyr106-Lys119; сайт 2 – Leu67-Ala77-Lys80-Phe81-Asp84-Lys85; сайт 3 – Ile64-Ala65-Leu67-Lys68-Glu69-Arg70-Ser71-Gly72-Val114-Rpo124.

Сайты связывания в гистоне H1.1 образованы следующими аминокислотными остатками: сайт 1 – His61-Pro62-Thr63-Tyr64-Ala65-Ile105-Gln109; сайт 2 – Lys104-Ser107-Val108-Lys111; сайт 3 – Tyr84-Ala87-Lys88-Glu91-Phe102; сайт 4 – Leu75-Ala85-Lys88-Phe89-Asp92-Lys93. По этим сайтам был проведен докинг пептида EDR.

Оказалось, что в случае гистона H1.6 наиболее энергетически выгодный комплекс пептид EDR образует по сайту 3 (рис. 3.34,

см. на вклейке). В сайтах 1 и 2 решений найдено не было. С гистонам Н1.3 наиболее энергетически выгодный комплекс пептид EDR образует с аминокислотными остатками His53, Tyr56, His89, Arg95-Lys96, локализованными в петлях. С гистонам Н1.1 наиболее энергетически выгодный комплекс пептид EDR образует в петлях, образованных а.о Pe72-Thr73, Glu77-Arg78, Lys134, Lys136 (рис. 3.35, см. на вклейке). Наилучшее решение докинга для связывания пептида EDR с линкерными гистонами Н1.6, Н1.3, Н1.1 соответствовало значениям энергии $-6,57$, $-6,83$ и $-7,20$ ккал/моль.

Заключение

Совокупность результатов, полученных методами физикохимии, показывает возможность взаимодействия пептида EDR с ДНК в растворе. При этом пептид EDR оказывает дестабилизирующий эффект на вторичную структуру макромолекулы ДНК и компактизирующее влияние на объем ее молекулярного клубка. Таким образом, в случае контакта пептида EDR с молекулой ДНК в клетке возможно его влияние на функциональные и структурные свойства этой важнейшей биологической макромолекулы.

Методом молекулярного моделирования были подобраны два предполагаемых сайта связывания для пептида EDR: $d(\text{CCTGCC})_2$ и $d(\text{CCAGC})_2$. С обоими сайтами пептид образует стабильные комплексы. Однако с сайтом $d(\text{CCAGC})_2$ пептид EDR взаимодействует с большей энергией, что указывает на образование энергетически более выгодного комплекса.

В промоторных участках генов TPH1 (ген триптофангидроксилазы – фермента, участвующего в синтезе серотонина), VIM1 (ген виментина) и CALM1 (ген кальмодулина) были обнаружены предполагаемые сайты связывания для пептида EDR. В генах TPH1 и CALM1 найден один сайт связывания, а в гене VIM1 – два сайта связывания. Анализ промоторных участков генов, кодирующих белки, регулирующие функциональную и антиоксидантную активность клеток (PPARA, PPARG, HSPA1A, SOD2, GPX1), также указывает на наличие сайтов связывания для пептида EDR. Так, для генов PPARA и GPX1 обнаружено по 3 предполагаемых сайта связывания, для PPARG – 5 сайтов, для HSPA1A – 4 сайта связывания. Эти гены были выбраны нами в связи с тем, что ранее было установлено влияние пептида EDR на их экспрессию и синтез соответствующих белков.

Таким образом, вначале для пептида EDR в качестве потенциальных мишеней эпигенетического действия в клетке были рас-

смотрены регуляторные участки ДНК (промоторные зоны генов). Оказалось, что сайт-специфическое взаимодействие пептидов с ДНК приводило к изменению характера экспрессии генов. Дальнейшие исследования показали, что короткие пептиды могут не только сайт-специфично связываться с ДНК, но и «распознавать» их по статусу метилирования. Такое специфическое связывание пептидов с ДНК, вероятно, может конкурировать со связыванием ДНК с разными ферментами, например ДНК-метилтрансферазой. Одним из наиболее вероятных механизмов активации генов пептидами является селективное связывание пептидов с промоторными сайтами генов, что делало эти сайты недоступными для ферментов ДНК-метилтрансфераз, и в результате промотор останется неметилированным, а это является решающим элементом активации большинства генов. Таким образом, специфические пептид-ДНК взаимодействия могут эпигенетически контролировать генетические функции клетки. Установлено, что короткие пептиды модулируют действие эндонуклеаз. Модуляция пептидами действия эндонуклеаз может происходить благодаря сайт-специфическому связыванию пептида и ДНК, которое защищает ДНК от ферментативного гидролиза. Модуляция действия эндонуклеаз пептидами, в свою очередь, модулируется гистонами, тем самым, в клетке гистоны хроматина определенно могли влиять на связывание коротких пептидов с ДНК.

При исследовании связывания FITC-меченных гистонов пшеницы с короткими пептидами *in vitro* по тушению флуоресценции было обнаружено, что пептид EDR и другие короткие пептиды связываются с гистонами H1.1, H1.3, H1.6, H2b, H3 и H4. Связывание пептидов с гистонами зависит от природы гистона, первичной структуры пептида, т.е. существует сайт-специфическое взаимодействие коротких пептидов с гистонами. Предполагается, что сайт-специфическое связывание коротких пептидов с гистонами может модулировать действие различных ферментов на гистоны хроматина и существенно влиять на множественные известные энзиматические модификации «хвостов» гистонов, служащие эпигенетическими механизмами регуляции генетических процессов. То есть пептиды помимо взаимодействия с ДНК могут регулировать активность генов и посредством взаимодействия с гистонами.

Установлено, что с гистоном H4 пептид EDR в основном образует сеть водородных связей с остатками, образующими мотивы Gly14-Ala15-Lys16 и Leu22-Arg23, Asn25. Наилучшее решение докинга для связывания пептида EDR с гистоном H4 по N-терминальному концу соответствует энергии $-6,97$ ккал/моль.

Пептид EDR образует сеть водородных связей с участком гистона H3, образованным аминокислотными остатками (а.о) Arg8-Lys9, Arg17, Arg26-Lys27, Ala31. Наилучшее решение докинга для связывания пептида EDR с гистоном H3 по N-терминальному концу соответствует энергии $-6,17$ ккал/моль. Пептид EDR связывается с гистоном H2b по сайту Ala29-Gly30-Pro40-Gly42-Lys43-Ser44. Наилучшее решение докинга для связывания пептида EDR с гистоном H2b по N-терминальному концу соответствует энергии $-6,57$ ккал/моль. В случае гистона H1.6 наиболее энергетически выгодный комплекс пептид EDR образует по сайту Ser51-Ile54-Ala55-Leu57-Lys58-Glu59-Gly62-Pro114-Ala115. С гистоном H1.3 наиболее энергетически выгодный комплекс пептид EDR образует с аминокислотными остатками His53, Tyr56, His89, Arg95-Lys96, локализованными в петлях. С гистоном H1.1 наиболее энергетически выгодный комплекс пептид EDR образует в петлях, образованных а.о Ile72-Thr73, Glu77-Arg78, Lys134, Lys136. Наилучшее решение докинга для связывания пептида EDR с линкерными гистонами H1.6, H1.3, H1.1 соответствовало значениям энергии $-6,57$; $-6,83$ и $-7,20$ ккал/моль.

Предполагается, что сайт-специфические взаимодействия коротких пептидов, в том числе пептида EDR, с ДНК и гистонами может служить контрольным эпигенетическим механизмом регуляции активности генов.

Литература

1. Альбертс Б., Джонсон А., Льюис Д. и др. Молекулярная биология клетки: в 3-х т. М.: Мир, 1994. Т. 1. 504 с.
2. Федорева Л.И., Киреев И.И., Хавинсон В.Х., Ванюшин Б.Ф. Проникновение коротких флуоресцентно-меченых пептидов в ядро клеток HeLa и специфическое взаимодействие пептидов с дезоксирибонуклеотидами и ДНК *in vitro* // Биохимия. 2011. Т. 76, № 11. С. 1505–1516.
3. Федорева Л.И., Смирнова Т.А., Коломийцева Г.Я. и др. Взаимодействие коротких пептидов с FITC-мечеными гистонами пшеницы и их комплексами с дезоксирибоолигонуклеотидами // Биохимия. 2013. Т. 78, № 2. С. 230–242.
4. Хавинсон В.Х., Соловьев А.Ю., Жилинский Д.В. и др. Эпигенетические аспекты пептидной регуляции старения // Успехи геронтологии. 2012. Т. 25, № 1. С. 11–16.
5. Alberts B., Bray D., Lewis J. et al. Molecular biology of the cell. New York: Garland Science, 1994.
6. Brown D.T. Histone variants: are they functionally heterogeneous? // Genome Biol. 2001. Vol. 2, N 7. P. 1–6.

7. *Debiec K.T., Cerutti D.S., Baker L.R.* et al. Further along the road less traveled: AMBER ff15ipq, an original protein force field built on a self-consistent physical model // *J. Chem. Theory Comput.* 2016. Vol. 12, N 8. P. 3926–3947.
8. *Edelsbrunner H., Facello M., Fu R., Liang J.* Measuring proteins and voids in proteins; Proceedings of the 28th Hawaii International conference on systems // *Science*, 1995. P. 256–264.
9. *Guryanov S.A., Kirilina E.A., Khaidukov S.V.* et al. Fluorescently labeled differentiating myelopoietin-4: Specific binding to and penetration into target cells // *Russ J. Bioorganic. Chem.* 2006. Vol. 32. P. 517–520.
10. *Kasianenko N.A., Diakonova N.E., Frisman E.V.* A study of the molecular mechanism of DNA interaction with divalent metal ions // *Mol. Biol.* 1989. Vol. 23. P. 975–982.
11. *Khavinson V., Linkova N., Kukanova E.* et al. Neuroprotective effect of EDR peptide in mouse model of Huntington's disease // *J. of Neurology and Neuroscience.* 2017. Vol. 8, N 1:166. P. 1–11.
12. *Khavinson V.Kh., Soloviev A.Yu., Tarnovskaya S.I., Linkova N.S.* Mechanism of biological activity of short peptides: Cell penetration and epigenetic regulation of gene expression // *Biol. Bull. Rev.* 2013. Vol. 3, N 6. P. 451–455.
13. *Vanyushin B.F., Khavinson V.Kh.* Short biologically active peptides as epigenetic modulators of gene activity // *Epigenetics – A different way of looking at genetics* / Eds. W. Doerfler, P. Böhm. Springer International Publishing Switzerland. 2016. P. 69–90.
14. *Kubo T., Yokoyama K., Ueki R.* et al. Structure and affinity of DNA binding peptides // *Nucleic. Acids Symp. Ser.* 2000. Vol. 44. P 49–50.
15. *Labute P.* LowModeMD – Implicit Low-Mode velocity filtering applied to conformational search of macrocycles and protein loops // *J. Chem. Inf. Model.* 2010. Vol. 50. P. 792–800.
16. *Morozova E.A., Linkova N.S., Khavinson V.Kh.* et al. In vitro interaction of the AEDL peptide with DNA // *J. of Structural Chem.* 2017. Vol. 58, N 2. P. 420–424.
17. *Pellegrino T., Sperling R.A., Alivisatos A.P., Parak W.J.* Gel electrophoresis of gold-DNA nanoconjugates // *J. Biomed Biotechnol.* 2007. Vol. 2007. P. 1–9.
18. *Qiao C., Bi S., Sun Y.* et al. Study of interactions of anthraquinones with DNA using ethidium bromide as a fluorescence probe // *Spectrochim. Acta A. Mol. Biomol. Spectrosc.* 2008. Vol. 70. P. 136–143.
19. *Soga S., Shirai, H., Kobori M., Hirayama N.* Use of amino acid composition to predict ligand-binding sites // *J. Chem. Inf. Model.* 2007. Vol. 47. P. 400–406.
20. *Trabulo S., Cardoso A.L., Mano M., De Lima M.C.P.* Cellpenetrating peptides – mechanisms of cellular uptake and generation of delivery systems // *Pharmaceuticals.* 2010. Vol. 3. P. 961–993.

Глава 4

Влияние пептида EDR на гипоксию головного мозга в моделях *in vivo* и *in vitro*

Развитие современного общества характеризуется распространенными явлениями ограничения общей двигательной активности – гипокинезии, к примеру, на механизированном производстве, также избыточным питанием и ожирением, неадекватными нервно-эмоциональными нагрузками, что отражается на индивидуальном и популяционном здоровье. В частности, гипокинезия является патогенетическим фактором развития сердечно-сосудистых и церебро-васкулярных заболеваний. Важным компонентом гипокинезии является кислородная недостаточность (гипоксия), которая характеризуется недостаточным снабжением тканей организма кислородом или нарушением его использования. Гипоксия – один из стрессорных факторов, приводящих к ускоренному старению, и относится к группе «системных» стимулов, действие которых на организм представляет собой прямую угрозу выживанию. Кислородной недостаточности сопутствует вторичная тканевая, или биоэнергетическая гипоксия, которая характеризуется последовательно развивающимися изменениями активности митохондриальных ферментных комплексов и, следовательно, нарушением функционирования электрон-транспортной сети, обеспечивающий выработку АТФ. Блокада конечного звена переноса электронов приводит, в свою очередь, к неполному восстановлению O_2 , что сопровождается усилением генерации активных форм кислорода (АФК).

Первой активной формой кислорода является супероксидный анион-радикал O_2^- , который образуется или восстановленным никотинамидадениндинуклеотидфосфат (НАДФН) – оксидазным комплексом цитоплазматической мембраны, либо мембран эндоплазматического ретикулума, или дыхательной цепью внутренней мембраны митохондрий. Существует еще один первичный радикал, имеющий не меньшее значение в жизни клетки, – это монооксид азота (NO), образуемый NO-синтазами. Ввиду своей высокой реак-

тивной способности супероксидный анион-радикал под действием фермента супероксиддисмутазы (СОД) превращается в еще одну активную форму кислорода – пероксид водорода H_2O_2 (реакция 1 на рис. 4.1). NO в присутствии супероксидного анион-радикала реагирует с ним с образованием токсичного иона пероксинитрита $ONOO^-$ (реакция 2 на рис. 4.1). Супероксид обладает способностью восстанавливать трехвалентное железо, хранимое в ферритине или входящее в состав железно-серных комплексов цепей переноса электронов, до двухвалентного (реакция 3 на рис. 4.1), что и происходит в неблагоприятных для клетки условиях. Двухвалентное железо может реагировать с $HOON$ с образованием чрезвычайно активного радикала гидроксила $\cdot OH$ (реакции 4–5 на рис. 4.1), а также способно разветвлять цепи окисления липидов, реагируя с липогидропероксидами (реакция 6 на рис. 4.1). Гидроксил-радикал может запускать процесс перекисного окисления липидов (ПОЛ) с образованием липидных радикалов. К числу АФК иногда относят также гипохлорит ClO^- и активные формы азота, связанные с превращением NO , прежде всего высшие окислы азота и пероксинитрит.

СОД считается ферментом антиоксидантной системы (АОС), так как более реактивный супероксидный анион-радикал превращает в менее опасный – пероксид водорода. Однако с помощью каталазы перекись водорода расщепляется до кислорода и воды. Еще одним важным ферментов антиоксидантной защиты является глутатионпероксидаза (ГП), которая разрушает перекись водорода и гидропероксиды липидов при окислении глутатиона, вос-

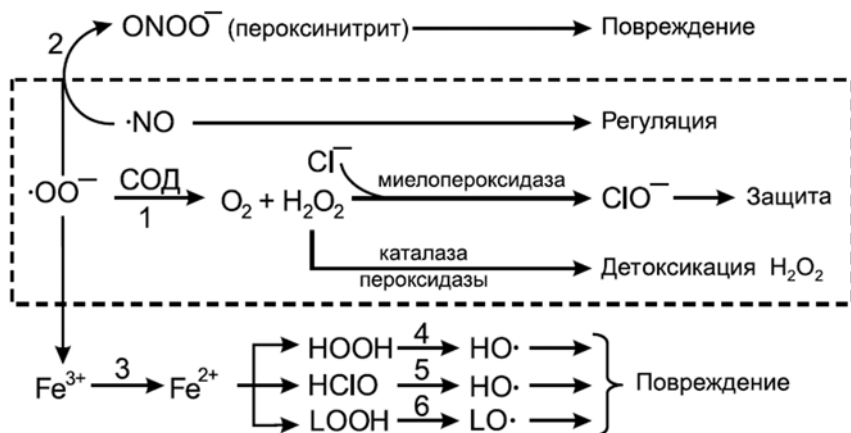


Рис. 4.1. Метаболизм активных форм кислорода [Владимиров Ю.А., Проскурина Е.В., 2009]

становление которого осуществляет глутатионредуктаза в присутствии НАДФН₂. Кроме того, разрушает гидроперекиси липидов фосфолипаза путем отщепления от фосфолипидов окисленных жирных кислот, содержащих гидроперекисную группу (LOOH), тем самым, предотвращая разветвление цепей окисления липидов в мембранах.

Каталаза, ГП, фосфолипаза являются ферментативным звеном антиоксидантной защиты. Неферментативным звеном являются производные фенола, способные восстанавливать свободные радикалы в гидрофобном слое мембран (витамин Е, убихинон и др.).

Усиление процессов свободнорадикального окисления (СРО) — одна из универсальных ответных клеточных реакций при воздействии на организм различных по своей природе стрессовых факторов. Избыточное образование свободных радикалов возникает в результате интенсификации биохимических реакций, обеспечивающих сохранение гомеостаза при прямом или опосредованном (например, через нейроэндокринные регуляторные механизмы) действии на организм разнообразных экстремальных факторов, в том числе гипоксии и гипокинезии. Это позволяет говорить о неспецифическом характере активации свободнорадикальных процессов.

Усиление свободнорадикальных процессов ведет к ответным реакциям со стороны антиоксидантной системы. При этом АОС рассматривается как система, принимающая непосредственное участие в молекулярных механизмах неспецифической резистентности организма к действию факторов внешней среды. Если воздействие какого-либо фактора или комплекса факторов приводит к избыточному образованию свободных радикалов, усилению СРО, то адаптация к такому воздействию в значительной степени связана с использованием резервов антиоксидантной защиты.

Согласованное действие неферментативного и ферментативного звеньев АОС, восполнение потребностей в восстановленных эквивалентах, прежде всего восстановленного никотинамидадениндинуклеотида (НАДН) и НАДФН, неспецифической резистентности организма и его адаптивных возможностей к воздействию разнообразных по своей природе патогенных факторов.

По современным представлениям, наиболее опасными в плане активации перекисных процессов при гипоксии являются состояния, характеризующиеся сменой временного выраженного нарушения кровоснабжения на его восстановление — реперфузией. Считается, что усиление образования свободных радикалов и перекисных соединений, которое происходит сразу вслед за нарушениями кровообращения, является ведущим фактором в патогенезе ишемических поражений тканей и органов.

Одной из главных причин может быть увеличение продукции супероксидного радикала в дыхательной цепи митохондрий при уменьшении парциального давления кислорода уже в процессе гипоксии. В этой связи весьма привлекательна гипотеза, высказанная В.П. Скулачевым, согласно которой образующийся из супероксидного аниона гидроксильный радикал может экстренно стимулировать вазодилатацию, т.е. способствовать укорочению периода гипоксии. Таким образом, клетки «заинтересованы» в как можно более раннем периоде генерации АФК. Биологическое значение этого явления объясняется способностью АФК обеспечивать расслабление гладкомышечных клеток сосудов и способствовать тем самым восстановлению кровоснабжения поврежденной ткани.

Однако если этот процесс будет успешным, возобновление снабжения тканей кислородом (реперфузия) несет с собой новую опасность повышенной продукции АФК вследствие появления массивных количеств кислорода в условиях полной восстановленности митохондриальной дыхательной цепи. В очаге гипоксии, в частности при ишемии сердечной мышцы, в отсутствие кислорода происходит целый ряд процессов, которые могут в дальнейшем вызывать усиление образования АФК. Во-первых, увеличивается активность НАДН-оксидазы, которая в присутствии O_2 может продуцировать супероксидные радикалы при окислении НАДН. Во-вторых, усиливается расщепление АТФ с образованием ксантина. В-третьих, при ишемии происходит трансформация ксантиндегидрогеназы в ксантиноксидазу. В результате этих процессов при реперфузии наблюдается окисление гипоксантина до мочевой кислоты с образованием O_2 , который может спонтанно или под действием супероксиддисмутазы образовывать H_2O_2 .

На более поздних стадиях ишемического поражения наблюдается приток в ткань нейтрофилов и других фагоцитирующих клеток, продуцирующих АФК, которые можно считать важными источниками образования активных метаболитов кислорода при гипоксии. Гипоксия непосредственно является одной из причин повышения адгезивных свойств гранулоцитов, а повреждение эндотелия сосудов вследствие активации фагоцитирующих клеток крови считают одним из основных факторов патогенеза реперфузионных или реоксигенационных нарушений. Взаимодействие перекиси водорода с галоидами, катализируемое миелопероксидазой фагоцитов, приводит к образованию гипогалоидов – наиболее токсичных метаболитов кислорода. Дополнительное образование токсичных АФК полиморфно-ядерными лейкоцитами связано с окислением НАДФН миелопероксидазой. НАДФН-зависимая оксидазная система в мембранах нейтрофилов является высокоэф-

фективным источником супероксидных радикалов, которые дают начало другим активным формам кислорода.

Наконец, немаловажным фактором усиления продукции АФК при гипоксии является увеличение содержания Fe^{2+} в цитоплазме. В частности, O_2 может восстанавливать Fe^{3+} до Fe^{2+} и, таким образом, способствовать накоплению Fe^{2+} в клетке, которое активирует СРО путем разветвления цепей окисления и способствует образованию $HO\cdot$ из H_2O_2 . Так, генерация радикалов $HO\cdot$ в левом желудочке ишемизированного сердца наблюдалась уже через 15 мин после нарушения коронарного кровообращения. Образование O_2 , а затем H_2O_2 и $HO\cdot$, приводит к окислительному стрессу и повреждению тканей, прежде всего посредством активации СРО.

Участие АФК и инициируемых ими процессов СРО в повреждении ткани при гипоксии и реоксигенации доказывается также тем, что антиоксиданты-«перехватчики» свободных радикалов уменьшают повреждение ткани. Избыточное образование и превращение АФК лежат в основе усиления процессов СРО и последующего повреждения клеток и субклеточных частиц при воспалении, гипоксических и гипероксических повреждениях. Существуют многочисленные экспериментальные и клинические данные, свидетельствующие о том, что окислительные повреждения клеточных мембран служат первым событием в цепи нарушений, вызванных действием неблагоприятных факторов на организм в целом, на участок ткани или отдельные клетки. Поскольку липидный бислой представляет собой обязательный структурный элемент любой клеточной мембраны, его повреждения и функциональные нарушения являются одной из универсальных причин цепи патологических процессов, лежащих в основе развития заболеваний различных органов человека.

Публикации последних десятилетий содержат обширную информацию о том, что продолжительное и интенсивное образование свободных радикалов приводит к усиленному расходованию на их обезвреживание эндогенных антиоксидантов, к модуляции активности, и в конечном счете — к ингибированию антиоксидантных ферментов (СОД, каталазы, ГП и др.) и снижению в тканях организма уровня сульфгидрильных ($SH-$) групп, входящих в состав молекул тиоловых соединений, как небелковой, так и белковой природы. О том, что причиной уменьшения содержания $SH-$ групп в биосубстратах является их окислительная модификация, свидетельствует одновременное увеличение количества их оксипроизводных — дисульфидных ($-SS-$) групп, которое было обнаружено при широком круге патологических состояний. Все эти факты позволяют говорить о неспецифическом характере изменений тиоловых групп в тканях при действии на организм вредных факторов различной природы.

Сдвиги тиол-дисульфидного равновесия приводят к радикальной перестройке режимов жизнедеятельности клетки: изменению ритмов деления, активности ферментов, проницаемости клеточных мембран, интенсивности метаболических процессов, что имеет большое значение в генезе различных форм патологии. В таких условиях поступление антиоксидантов в организм извне может сыграть решающую роль в повышении буферной емкости АОС и в увеличении адаптационного резерва организма. Особое место среди этих соединений принадлежит геропротекторным пептидным препаратам, созданным и исследуемым на протяжении нескольких десятилетий в Санкт-Петербургском институте биорегуляции и геронтологии.

4.1. Оценка антиоксидантных, мембранопротекторных и актопротекторных свойств пептида EDR при гипоксии и других экстремальных воздействиях

Первым этапом исследований антиоксидантных свойств пептида EDR *in vitro* стало исследование прямого антиоксидантного эффекта пептида EDR на выявление способности восстанавливать стабильный радикал 1,1-дифенил-2-пикрилгидразил (ДФПГ). Активность пептида EDR оценивали по изменению оптической плотности пробы в присутствии стабильного ДФПГ. В качестве отрицательного контроля выступал карнозин, который является гидрофильным нейропептидом, способным связывать гидроксил-радикал и предотвращать окислительные повреждения клеточных структур. В качестве положительного контроля выступал N-ацетилцистеин (NAC). Сильное антиоксидантное действие NAC оказывает путем связывания своих SH-групп с окислительными радикалами, также участвует в синтезе глутатиона – компонента антиоксидантной системы.

Результаты показали, что пептид EDR в диапазоне концентраций 0,5–1 мМ не обладал способностью взаимодействовать с ДФПГ-радикалом. Кроме того, пептид EDR даже несколько увеличивал оптическую плотность проб, что могло служить косвенным указанием на возможность его взаимодействия с ДФПГ с образованием промежуточных продуктов, природа которого остается неизвестной.

Затем были проведены исследования *in vitro* по выявлению эффектов пептида EDR на скорость осмотического гемолиза эритроцитов.

Влияние пептида EDR на скорость осмотического гемолиза эритроцитов

В этой связи интерес представляет исследование мембрано-протекторных свойств пептида EDR. Одним из наиболее распространенных способов разрушения клеточных мембран, широко используемых в том числе и при исследовании мембран эритроцитов, является осмотический шок. Благодаря осмотическому шоку осуществляется преимущественное движение молекул воды через полунепроницаемые мембраны (непроницаемые для растворенного вещества и проницаемые для воды) из области с меньшей концентрацией растворимого вещества в области с его большей концентрацией, что играет важную роль в различных биологических процессах, в том числе гемолизе эритроцитов. Соединения, обладающие выраженной антиоксидантной активностью, могут способствовать стабилизации мембран эритроцитов, как и других клеточных мембран, благодаря подавлению процессов ПОЛ, приводящих к их разрушению.

При исследовании мембраностабилизирующего действия пептида EDR на модели осмотического гемолиза эритроцитов пептид EDR, а также NAC и карнозин, выступающие в качестве пептидов сравнения, инкубировали в конечной концентрации 1–5 мМ с цельной кровью здоровых доноров, и после ряда манипуляций регистрировали исходную оптическую плотность содержимого кюветы. Затем в кювету добавляли 1,2 мл воды, регистрируя гемолиз, вызванный снижением осмотичности среды, на спектрофотометре ($\lambda = 660$ нм).

Исследуемые соединения по-разному влияли на протекание осмотического гемолиза эритроцитов крыс. NAC вообще не оказывал влияния на осмотический гемолиз, что закономерно, поскольку в развитие осмотической неустойчивости свободнорадикальные процессы не вовлекаются. Карнозин понижал скорость гемолиза на 35–40% уже в концентрации 0,4 мМ, а пептид EDR проявлял двойной эффект: при концентрациях 1–2 мМ он несколько увеличивал скорость гемолиза эритроцитов крыс, а при повышении концентрации стимулирующий эффект сменялся подавлением процесса гемолиза. Сходный эффект пептида EDR наблюдался и на эритроцитах человека: при концентрации, равной 3,0 мМ, повышал скорость гемолиза, тогда как повышение концентрации до 5,0 мМ вызывало противоположное действие – возрастание устойчивости эритроцитов к осмотическому гемолизу (рис. 4.2). Полученные результаты указывают на наличие у пептида EDR мембран-

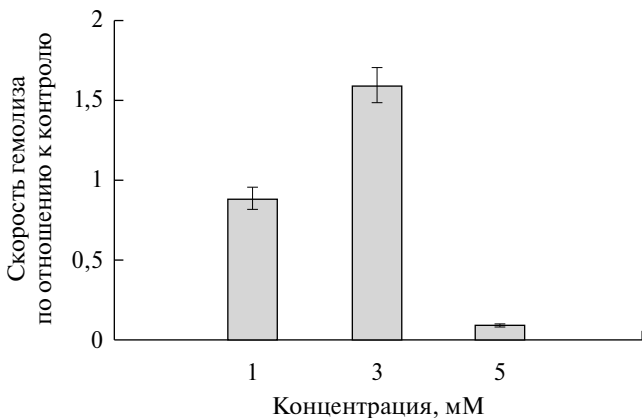


Рис. 4.2. Влияние пептида EDR на скорость осмотического гемолиза эритроцитов человека

нопротекторных свойств, не связанных с прямой антиоксидантной активностью.

При исследовании антиоксидантных свойств пептида EDR при гипоксии в качестве экспериментальной модели оксидативного стресса была использована гипобарическая гипоксия у крыс. В экспериментах использовали крыс-самцов линии Wistar массой 185–200 г. Окислительный стресс создавали с помощью острой гипобарической гипоксии, моделируя ее в барокамере регулируемым потоком воздуха для предотвращения развития гиперкапнии. С помощью вакуумного насоса давление в барокамере снижали за 1 мин до конечного значения 0,125 атм. В таких условиях животных выдерживали до остановки дыхания, после чего возвращали их в условия нормального давления, подавая в камеру атмосферный воздух в течение 1 мин.

В течение эксперимента регистрировали следующие параметры:

- время до потери дыхания «на высоте» (с);
- время восстановления позы (с), т. е. период от остановки дыхания до момента, когда животное после «спуска с высоты» и восстановления дыхания в условиях нормобарии принимало нормальную позу;
- время реституции (с), которое составляло общую продолжительность периода восстановления физиологической активности после гипоксического воздействия.

Для определения эффективности действия пептида EDR использовали такие параметры, как смертность и «коэффициент

реституции», выражающий отношение продолжительности времени реституции ко времени до остановки дыхания в барокамере.

Пептид EDR вводили в дозе 10 мкг/кг массы животного внутрибрюшинно ежедневно в течение 5 сут, предшествующих гипоксии. Для сравнения в исследование были включены и другие пептиды (KE, KED, AEDG). Крысы контрольной группы получали внутрибрюшинно инъекции физиологического раствора по такой же схеме. Численность животных в каждой группе составляла 10 особей.

Установлено (табл. 4.1), что пептид EDR при внутрибрюшинном введении, предшествующем гипоксии, способен значительно увеличивать резистентность животных к гипоксии – время до потери дыхания с 72 с (контроль) возрастало до 149–188 с. При этом величина восстановления позы после снятия гипоксического воздействия была несколько выше контрольного значения, что соответствовало более длительному времени, в течение которого животные сохраняли дыхание при гипоксии. Общее время реституции у крыс, которым вводили пептид EDR, возрастало относительно контроля.

Таким образом, изучение влияния пептида EDR и других регуляторных пептидов на крыс в условиях острой сублетальной гипобарической гипоксии показало, что дольше всего дыхательную активность в барокамере сохраняли крысы, получавшие инъекции пептида EDR. По совокупности полученных результатов пептид

Таблица 4.1

Влияние пептидов EDR, KE, KED, AEDG на физиологические характеристики крыс, перенесших воздействие острой гипобарической гипоксии

Параметр	Контроль (физ. раствор)	Пептид			
		EDR	KE	KED	AEDG
Время до потери дыхания, с	72 ± 10	184 ± 30 (<i>p</i> <0,014)	149 ± 47 (<i>p</i> <0,08)	88 ± 9	150 ± 38 (<i>p</i> <0,08)
Время восстановления позы, с	126 ± 21	152 ± 16	152 ± 31	111 ± 16	103 ± 28
Время реституции, с	202 ± 32	291 ± 35 (<i>p</i> <0,01)	302 ± 50 (<i>p</i> <0,08)	194 ± 24	185 ± 33
Коэффициент реституции (3/1)	2,8	1,6	2,0	2,2	1,2
Смертность, %	10	10	20	10	20

Примечание: Критерий достоверности указан по отношению к контрольной группе животных, получавших инъекции физиологического раствора.

EDR можно признать наиболее эффективным протектором, обеспечивающим наилучшую адаптацию крыс к гипоксическому воздействию.

Гипоксия является важным компонентом распространенного на сегодняшний день явления — гипокинезии. Гипокинезия вследствие ограничения общей двигательной активности является фактором, способствующим преждевременному старению и одним из основных симптомов, ассоциированных с возрастом нейродегенеративных заболеваний. Повышение физической работоспособности при гипокинезии и ее важнейшей компоненты — общей физической выносливости — составляет предмет физиологии труда различных профессиональных групп, в том числе при экстремальных видах деятельности. В связи с этим научный поиск, оценка и апробация отдельных веществ и композиций, эффективных в отношении работоспособности, представляют самостоятельное направление исследований в этой области.

Обращает внимание сходство биохимического эффекта пептида EDR с действием актопротекторов, к примеру метапрота, которые повышают физическую выносливость в чрезвычайных ситуациях (гипертермия, гипоксия, гиподинамия и др.), тормозят развитие утомления и ускоряют восстановление физической работоспособности после истощающих физических нагрузок. Перечисленные эффекты актопротекторов, как известно, обусловлены интенсификацией процессов глюконеогенеза, интенсивного обновления короткоживущих белков при повышенной функциональной активности тканей. При известном сходстве биохимического эффекта пептида EDR с действием актопротекторов становится логичным оценить влияние пептида EDR на физическую работоспособность животных и провести сравнительный анализ его эффекта с действием известного актопротектора метапрота.

Актопротекторные свойства пептида EDR были изучены путем оценки физической работоспособности беспородных крыс (24 особи, самцы) массой 250–300 г в возрасте 5 месяцев в условиях моделирования истощающих физических нагрузок по методике «бег на тредбане до отказа», позволяющей определить реальные резервные возможности организма. Всех животных содержали в клетках группами по 6 особей при свободном доступе к корму и воде. Эксперименты осуществляли с соблюдением принципов гуманности, изложенных в документах Европейского Сообщества (86/609/ЕС). Животные были разделены на четыре группы. Первая группа — виварный контроль — не участвовала в тренинге на тредбане. Остальные три группы животных подвергались тренировочному бегу в течение 13 сут, причем вторая группа являлась

лабораторным контролем (без введения биологически активных веществ), а в третьей и четвертой группах – внутривентриально вводили соответственно актопротектор метапрот и пептид EDR (в течение 10 дней с 2-дневным перерывом после 5 сут). Была использована следующая дозировка препаратов: метапрот – 0,17 мл (этилтиобензимидазол гидробромид моногидрат 250 мг, дозировка 25 мг/кг), пептид EDR (серия 030413) – 0,22 мл/сут (75 мкг/кг).

За 3 суток до введения метапрота и пептида EDR определяли фоновые значения физической работоспособности. Затем после введения препаратов ежедневно проводили тестирование крыс и определяли относительное значение физической работоспособности, которое рассчитывали как отношение продолжительности бега после введения препарата к продолжительности фонового выполнения теста и выражали в процентах. На 5-е и 10-е сутки после введения препаратов определяли гематологические и биохимические показатели.

Для проведения биохимических и гематологических исследований кровь брали из ретробульбарного венозного сплетения глаза. Оценивали основные количественные показатели крови, позволяющие судить о возможностях организма реализовать кислородный запас и неспецифическую защиту в условиях регулярных физических нагрузок – количество эритроцитов и лейкоцитов в 1 мм^3 (1 мл), а также содержание гемоглобина и тромбоцитов. При биохимическом исследовании определяли активности ферментов: аланинаминотрансферазы (АЛТ), аспаратаминотрансферазы (АСТ), лактатдегидрогеназы (ЛДГ), креатинкиназы (КрК); содержание субстратов: креатинина, холестерина, глюкозы, лактатов, магния, кальция.

Тредбан был оборудован электропроводящей решеткой (ток 10 мА), расположенной с торца ленты. Скорость движения ленты – 35 м/мин. Критерием остановки эксперимента являлось троекратное (в течение минуты) пассивное поведение животного при контакте с электрической решеткой.

Предварительное тестирование показало отсутствие изменений показателей крови и работоспособности у крыс при внутривентриальном введении физиологического раствора, в связи с чем в работе все сравнения проводили с группой лабораторного контроля, подвергаемой бегу на тредбане без введения препаратов.

Достоверность полученных результатов физиологических и гематологических исследований оценивали с помощью параметрического критерия Стьюдента (t-тест), а биохимических – с использованием непараметрического критерия Уилкоксона для связанных выборок.

Оценка физической работоспособности животных по методике «бег на тредбане до отказа»

Сравнительный анализ работоспособности крыс по показателю продолжительности бега на тредбане свидетельствует о положительной динамике времени выполнения теста в процессе 10-дневной тренировки во всех трех группах (две опытные и одна — лабораторного контроля). Из графиков, представленных на рис. 4.3, следует, что при введении метапрота достоверное отличие продолжительности бега по отношению к фоновым значениям отмечалось с 7-х суток эксперимента. При этом зафиксированная положительная динамика времени выполнения теста в течение 1-й недели исследований сопоставима с таковой в группе контроля. Поэтому увеличение продолжительности бега к 5-м суткам на 8,4 мин (240% по сравнению с фоном) можно трактовать как проявление эффекта тренированности. В то же время к 10-м суткам увеличение времени выполнения теста на 13,8 мин (330% по сравнению с фоновыми значениями) позволяет интерпретировать результаты не только в связи с тренировочным процессом, но и как фармакологический эффект метапрота. При том, что среднее значение продолжительности бега до отказа составляло 20 мин, максимальное время выполнения теста в этой серии превысило 30 мин. После отмены метапрота (11-е сут) выраженная отрицательная динамика продолжительности бега крыс (до 10 мин в среднем по группе) является аргументом в пользу положительного влияния метапрота

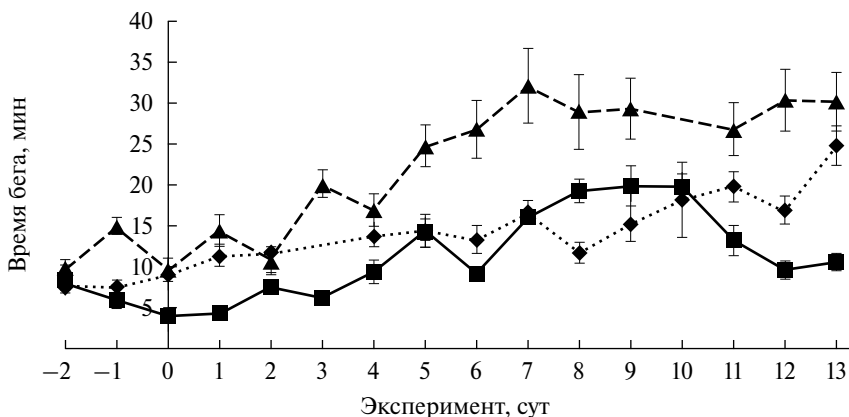


Рис. 4.3. Сравнительные характеристики длительности бега на тредбане крыс контрольной группы и животных с введением метапрота и пептида EDR: ромб — контроль; четырехугольник — метапрот; треугольник — пептид EDR

на физическую работоспособность и общую физическую выносливость, а также свидетельствует о выраженном эффекте отмены.

У крыс, получавших пептид EDR, достоверные от фона различия в продолжительности работы на тредбане были отмечены уже на 3-и сутки введения вещества (увеличение на 8,7 мин, что составляет 175% по сравнению с фоновыми показателями). К концу 1-й недели эксперимента (5-е сут) длительность бега возросла на 13,2 мин (214%), а к 10-м суткам увеличилась на 18 мин (254% от фоновых значений). Достигнутый эффект сохранялся в течение 3-х дней после отмены препарата.

Таким образом, в группе крыс, получавших пептид EDR, среднее значение времени выполнения теста достигло 30 мин и затем незначительно колебалось в пределах этого значения. Максимальная зафиксированная продолжительность работы на тредбане в данной группе составила 65 мин.

В то же время в группе лабораторного контроля увеличение времени бега по сравнению с фоном составило 6 мин (168%) и 10 мин (212%) на 5-е и на 10-е сутки соответственно, и объяснялось исключительно эффектом тренированности.

На рис. 4.4 показано изменение относительного процентного показателя работоспособности животных на фоне хронического введения метапрота и пептида EDR. На 7–10-е сутки введения метапрота отмечен пик прироста работоспособности крыс, причем динамика этого относительного показателя была больше, чем при введении пептида EDR; при этом абсолютные временные показатели бега при введении пептида EDR превышали таковые

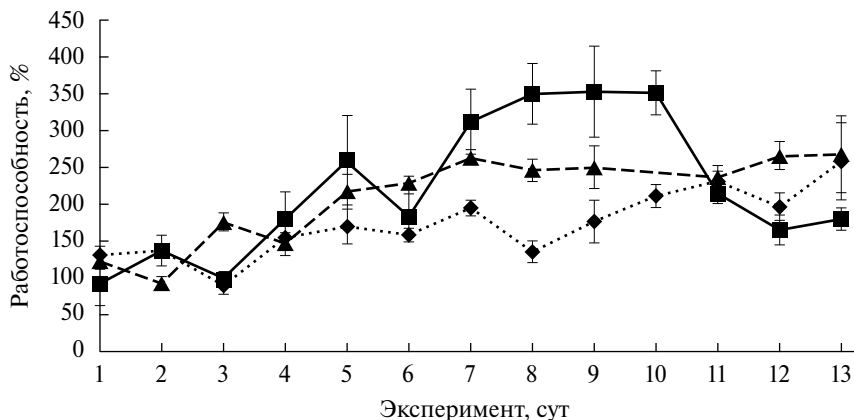


Рис. 4.4. Изменение работоспособности крыс (по результатам динамики продолжительности бега на тредбане). Пояснения см. на рис. 4.3

для метапрота. Однако при отмене препарата работоспособность животных снижалась. Этот эффект наблюдался дважды, так как в 1-й день второй серии метапрот животным был введен после пробежки. В результате обнаруженная вначале положительная динамика работоспособности сменилась устойчивым снижением этого показателя на 75% по сравнению с последними сутками введения вещества.

Физическая работоспособность животных контрольной группы постепенно росла по мере тренированности. Примерно так же изменялась и работоспособность животных, получавших пептид EDR, но она росла быстрее, увеличиваясь в 2 раза уже к концу первой серии опытов. В отличие от метапрота при применении пептида EDR не наблюдался синдром отмены препарата.

Таким образом, введение пептида EDR вызывает более стойкое повышение работоспособности крыс в тесте «бег на тредбане до отказа», которое, в отличие от животных, получавших метапрот, не прекращалось и после отмены препарата.

Оценка гематологических показателей

Динамика показателей крови у животных, участвующих в эксперименте, показывает, что у крыс опытных групп при введении фармакологических веществ в отличие от контрольной группы наблюдалось уменьшение значений всех гематологических показателей. При введении пептида EDR отмеченная динамика показателей крови была достоверной и максимальной на 10-е сутки (табл. 4.2).

Данные, представленные в табл. 4.3, демонстрируют уменьшение значений показателей крови у крыс двух опытных групп в относительных единицах. В то же время у крыс из группы лабораторного контроля наблюдалось увеличение значений всех исследуемых гематологических показателей как в конце 1-й недели (на 5-е сут), так и на 10-е сутки. Причем к концу 2-й недели данное увеличение достигло пиковых значений и достоверно отличалось от фоновых значений. Так, количество лейкоцитов к концу 2-й недели эксперимента увеличивалось на 64%, содержание гемоглобина – на 15%, а количество тромбоцитов – на 124% (см. табл. 4.3). У крыс из группы виварного контроля изменения значений показателей крови были минимальными, не выходящими за границы нормативных значений для животных данного вида.

Таким образом, гематологические исследования подтвердили адаптивный характер динамики значений показателей крови. Изменения количественных показателей крови экспериментальных

Таблица 4.2

Динамика показателей крови экспериментальных крыс, $M \pm t$

Эксперимент, сут	Показатель			
	Лейкоциты, тыс./мкл	Эритроциты, млн/мкл	Гемоглобин, г/л	Тромбоциты, тыс./мкл
<i>Виварный контроль</i>				
Фон 1	14,7 ± 1,6	8,2 ± 0,8	151,0 ± 1,0	865,0 ± 147,0
Фон 2 (7-е сут)	13,4 ± 1,2	7,6 ± 0,3	141,0 ± 4,0	1033,0 ± 64,0
<i>Контроль (без введения веществ)</i>				
Фон	12,1 ± 1,3	7,8 ± 0,4	137,0 ± 3,8	608,0 ± 63,0
5-е сут	16,2 ± 1,4*	8,2 ± 0,5	142,0 ± 8,5	1050,0 ±
10-е сут	19,9 ± 2,6**	8,9 ± 0,4	158,0 ± 8,2 **	123,0** 1364,0 ± 96,0 ***
<i>Метанпрот</i>				
Фон	19,4 ± 3,4	9,5 ± 0,7	166,8 ± 11,7	1001,0 ± 143,0
5-е сут	12,4 ± 1,7	7,8 ± 0,7	139,2 ± 12,6	988,0 ± 210,0
10-е сут	13,0 ± 2,0	8,4 ± 0,4	150,8 ± 8,4	1081,0 ± 223,0
<i>Пентид EDR</i>				
Фон	14,6 ± 1,2	8,8 ± 0,6	158,2 ± 8,8	847,0 ± 103,0
5-е сут	8,4 ± 1,2**	8,4 ± 0,3	144,7 ± 7,0	789,0 ± 111,0
10-е сут	10,2 ± 1,3*	7,0 ± 0,5*	128,6 ± 4,3 **	575,0 ± 120,0

Примечание: Изменение достоверно относительно группового фона при: * – $p \leq 0,05$; ** – $p \leq 0,01$; *** – $p \leq 0,001$.

Таблица 4.3

Изменение гематологических показателей относительно фона у животных опытных групп через 5 и 10 суток введения фармакологических препаратов, %

Показатель, отн. ед.	Через 5 сут		Через 10 сут	
	Группа 3	Группа 4	Группа 3	Группа 4
Количество лейкоцитов	-36	-42	-33	-30
Количество эритроцитов	-18	—	-12	-20
Содержание гемоглобина	-17	-8	-10	-19
Количество тромбоцитов	-1	-7	+8	-32

животных коррелировали с продолжительностью ежедневных физических нагрузок независимо от вводимого препарата — метапрота или пептида EDR. Введение пептида EDR приводило к наиболее выраженным изменениям гематологических показателей на фоне максимальной продолжительности «бега до отказа».

Оценка биохимических показателей

Из всех полученных результатов достоверными оказались следующие. Физическая нагрузка животных группы лабораторного контроля вызывала рост активности креатинина (рис. 4.5, Б, см. на вклейке), что опосредованно отразило динамику его образования в реакции синтеза АТФ из АДФ и креатинфосфата. Выполнение физической нагрузки обеспечивалось энергией ферментативного синтеза АТФ в обратимой реакции, катализируемой КрК, а при высоких нагрузках процессом гликолиза, что объясняет снижение уровня глюкозы в крови контрольных мышей, тренирующихся на тредбане на 10-е сутки (рис. 4.5, Д). Кроме того, наблюдалось повышение уровня молочной кислоты в контрольной группе в течение нагрузки с $1,58 \pm 0,22$ до $7,10 \pm 0,98$ ммоль/л.

При хроническом введении метапрота установлено падение активности (рис. 4.5, В) с $84,9 \pm 4,9$ до $72,1 \pm 3,9$ ммоль/л, что может объясняться уменьшением проницаемости мембран клеток органов, депонирующих молекулы фермента, что соответствует литературным данным о влиянии стресс-факторов на проницаемость клеток. Содержание лактатов в течение нагрузки было увеличено с $2,65 \pm 0,20$ до $6,40 \pm 1,25$ ммоль/л. Подобная тенденция наблюдалась и у крыс, которым вводили пептид EDR. Кроме того, как в группе с введением пептида EDR, так и в группе с метапротом наблюдалось падение активности КрК (рис. 4.5, А), однако в первом случае оно было более выраженным (с $361,0 \pm 95,4$ до $103,0 \pm 13,7$ ммоль/л), чем в группе с метапротом (с $308,0 \pm 63,0$ до $180,7 \pm 15,0$ ммоль/л), и сопровождалось уменьшением концентрации ионов магния (рис. 4.5, Г) на 12%. Снижение активности КрК при введении метапрота по сравнению с фоновыми значениями с учетом снижения уровня глюкозы крови (рис. 4.5, Д) свидетельствует о переключении энергообеспечения на путь, связанный с утилизацией глюкозы. Выраженный рост уровня лактатов (рис. 4.6, см. на вклейке) свидетельствует о субмаксимальном уровне и анаэробной составляющей физической нагрузки.

Утомление, вызванное физическими нагрузками (ФН) субмаксимальной мощности, связано с истощением запасов энергии

тических субстратов (АТФ, гликогена) в тканях, обеспечивающих этот вид работы, и накоплением продуктов их обмена в крови (молочной кислоты, креатинина). Биохимические исследования показали, что субмаксимальная ФН крыс в тредбане (20 мин и выше при скорости 35 м/мин) при введении препаратов существенно не истощает запасы креатинина (рис. 4.5, Б) в крови, так как энергия вырабатывается не за счет реакции, катализируемой КрК, а в связи с процессами, связанными с утилизацией глюкозы. При этом увеличение содержания недоокисленного продукта (лактата, см. рис. 4.6) свидетельствует о существенной роли анаэробной составляющей энергетического обмена.

Результаты биохимических исследований свидетельствуют о компенсаторном характере наблюдаемых изменений биохимических показателей крови. Известно, что метапрот обладает выраженным актопротекторным свойством, позволяющим организму адаптироваться к стресс-факторам, связанным с физическими и нервно-эмоциональными нагрузками. При этом эффект метапрота связан с метаболическими процессами, стимулируя, с одной стороны, глюконеогенез, а с другой – синтез короткоживущих белков в интенсивно работающих тканях на фоне физической нагрузки. Учитывая сходный характер прироста физической работоспособности у животных в двух опытных группах, а также однотипные изменения исследуемых гематологических и биохимических показателей под действием как метапрота, так и пептида EDR, можно полагать, что пептид EDR, так же как и метапрот, обладает актопротекторным действием.

4.2. Влияние пептида EDR на моноаминергические системы мозга при гипоксии

Гипоксически-ишемические поражения являются одним из факторов, приводящих к развитию нейродегенеративных процессов. Механизмы действия гипоксии на уровне клеток мозга изучены достаточно хорошо: изменяется баланс нейромедиаторов и продуктов их обмена в структурах мозга, нарушаются структурно-функциональные свойства клеточных мембран, что может приводить к гибели клеток. В условиях гипоксии изменяется работа генетического аппарата клетки, инициируется транскрипция специфических генов, ответственных за программируемую гибель клетки. Патологические изменения в центральной нервной системе зависят от длительности гипоксического воздействия и от этапа онтогенетического развития центральной нервной системы.

Один из возможных путей коррекции негативных последствий гипоксии – использование пептидных биорегуляторов. Это обусловлено, прежде всего, их полифункциональностью и способностью к запуску каскадных реакций. Геропротекторные свойства ряда пептидных препаратов продемонстрированы на экспериментальных моделях, а также в клинической практике. К факторам, оказывающим геропротекторный и адаптогенный эффект, относят и нейропептиды. Нейропептиды как эндогенные нейромодуляторы играют важную роль в нормализации измененной деятельности мозга путем действия на свободнорадикальные процессы, гормоны и медиаторные системы.

В связи с тем что ранее была показана высокая эффективность пептида EDR на свободнорадикальные процессы в экспериментальных моделях, сопровождающихся ишемическими/гипоксическими нарушениями, следующим этапом исследования эффективности пептида EDR при гипоксических нарушениях было выявление механизмов влияния данного пептида на медиаторные, в частности моноаминергические, системы мозга.

Одним из исследований механизмов влияния пептида EDR на моноаминергические системы мозга при гипоксии было изучение влияния пептида EDR на содержание моноаминов в мозге 18-месячных беспородных белых крыс-самцов при двусторонней окклюзии сонных артерий (ОСА) как модели гипоксических нарушений.

18-месячных крыс (старые животные) ($n=80$) содержали в условиях вивария на стандартном пищевом рационе с 12-часовым свето-темновым режимом. Все подопытные животные были разделены на следующие группы: 1 группа – ложнооперированные животные ($n=20$), которым в течение 5-ти дней вводили в равном объеме 0,9%-ный раствор натрия хлорида (контрольная группа); 2 группа – животные ($n=20$), которым в течение 5-ти дней вводили в равном объеме 0,9%-ный раствор натрия хлорида, затем обездвиживали введением тиопенталового наркоза и проводили перевязку правой сонной артерии (СА) на 24 часа и левой сонной артерии на 3 минуты с последующей 24-часовой реоксигенацией; 3 группа – ложнооперированные животные ($n=20$), которым внутрибрюшинно вводили пептид EDR в дозе 10 мкг/кг массы тела в течение 5-ти дней перед операцией (пептид EDR); 4 группа – животные ($n=20$), которым внутрибрюшинно вводили пептид EDR в дозе 10 мкг/кг массы тела в течение 5-ти дней, затем проводили перевязку правой сонной артерии на 24 часа и левой сонной артерии на 3 минуты с последующей 24-часовой реоксигенацией (пептид EDR + ОСА).

В работе использовали модель двусторонней ОСА с целью развития у животных ишемических и реперфузионных повреждений структур мозга. Ишемизация мозга достигалась перевязкой левой СА и через минуту – временной окклюзией (на 3 мин) правой СА с последующей 24-часовой реоксигенацией. Крыс обездвигивали введением 1,2 мл 1%-ного раствора тиопентала на 100 г массы тела животного. Все хирургические процедуры проводили стерильно.

Содержание норадреналина, адреналина, дофамина (ДА) и 3,4-диоксифенилаланина (ДОФА) определяли с помощью обращенно-фазного варианта высокоэффективной жидкостной хроматографии.

Результаты по выявлению эффектов ОСА на содержание моноаминов в структурах мозга 18-месячных крыс были следующие (рис. 4.7). В коре больших полушарий выявлено значительное понижение уровня НА на 42% ($p \leq 0,05$), а в стволовых структурах – на 22% относительно контрольной группы. Уровень адреналина вырос как в коре больших полушарий (на 65%, $p \leq 0,05$), так и в стволовых структурах (на 154%, $p \leq 0,05$).

Существует представление о том, что энергетический метаболизм в мозге регулируется через активацию β_2 -адренорецепторов адреналином, а не НА. При этом увеличение уровня адреналина в мозге способствует усилению гликогенолиза и гликолиза. Извест-

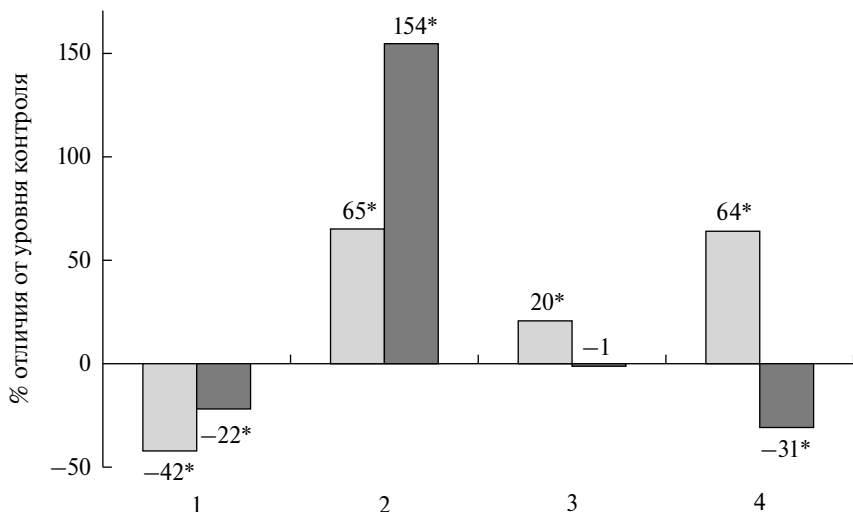


Рис. 4.7. Влияние окклюзии сонных артерий на содержание норадреналина (1), адреналина (2), ДОФА (3) и дофамина (4) в структурах мозга 18-месячных крыс; * – $p \leq 0,05$ (данные статистически значимы по отношению к контролю); светлый столбик – кора больших полушарий, темный – стволовые структуры

но, что гликогенолиз осуществляется при участии фосфоорилазы, которая активируется путем фосфорилирования при помощи АТФ. При этом окислительное карбоксилирование в условиях энергетического дефицита в мозге усиливается через β 2-адренергический механизм. Также установлено, что регуляция энергетического метаболизма осуществляется и норадреналином. Установлено, что повышение уровня НА в мозге приводит к снижению содержания гликогена и АТФ, увеличению содержания пирувата и лактата, активности пируваткиназы и лактатдегидрогеназы, понижению активности фруктозо-1,6-бифосфатазы. Вероятно, эффекты НА на гликолиз и гликогенолиз опосредуются через активацию не β 2, а другого типа адренорецепторов.

Таким образом, на фоне возрастания содержания адреналина в структурах мозга крыс, подвергнутых ОСА, выявлено истощение норадреналина и дофамина. Дефицит норадренергической и дофаминергической систем проявляется в поведенческих реакциях.

При изучении изменений соотношений нейромедиаторов под влиянием ОСА у 18-месячных крыс было обнаружено следующее. Наблюдали значительное снижение индекса НА/ДА на 65% ($p \leq 0,05$) в коре больших полушарий, а также соотношения ДОФА/дофамин в стволовых структурах мозга на 44%. Предположительно такое перераспределение активности катехоламинергических систем в структурах мозга 18-месячных крыс под влиянием ОСА связано с изменением уровня функционирования адренергических рецепторов.

Для исследования эффектов пептида EDR, введенного крысам перед ОСА, была проведена серия экспериментов по изучению влияния пептида EDR на баланс нейромедиаторов в мозге ложнопериоперированных животных (рис. 4.8). При введении пептида EDR выявлено увеличение уровня адреналина как в коре больших полушарий (на 27%, $p \leq 0,05$), так и в стволовых структурах (на 43%, $p \leq 0,05$). Также в коре больших полушарий установлено возрастание содержания ДА на 40% ($p \leq 0,05$) относительно контроля.

Поскольку с возрастом происходит снижение энергетического метаболизма во всем организме и в мозге, в частности, то возрастание содержания адреналина в мозге 18-месячных крыс может косвенно свидетельствовать о повышении его энергообеспечения под влиянием пептида EDR.

Также в коре больших полушарий 18-месячных крыс под влиянием введения пептида EDR выявлено значительное снижение индекса ДОФА/дофамин на 29% ($p \leq 0,05$) по сравнению с контролем.

Следовательно, пептид EDR способствует активации дофаминергической системы в коре больших полушарий мозга 18-месяч-

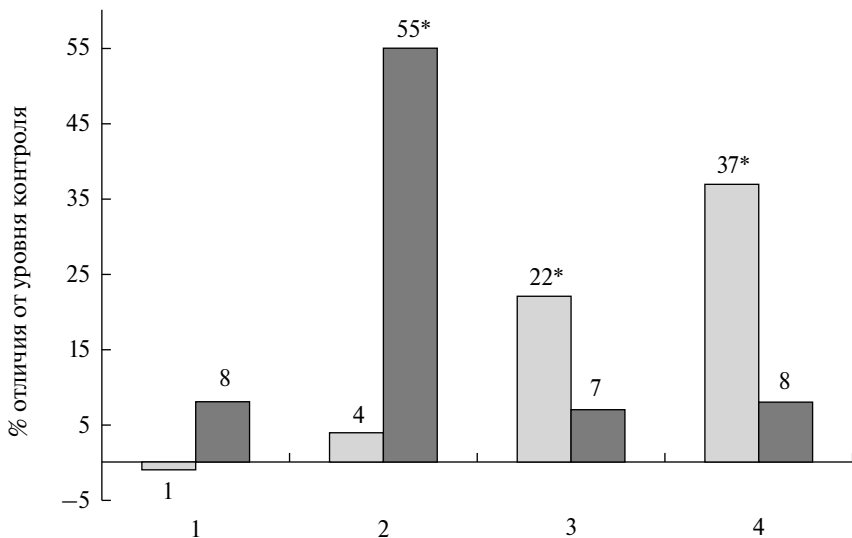


Рис. 4.8. Влияние введения пептида EDR перед окклюзией сонных артерий на содержание норадреналина (1), адреналина (2), ДОФА (3) и дофаминна (4) в структурах мозга 18-месячных крыс; * – $p \leq 0,05$ (данные статистически значимы по отношению к контролю). Пояснения см. на рис. 4.7

ных ложнооперированных крыс. При этом пептид EDR реализует свои эффекты через повышение активности этой системы только в стволовых структурах мозга посредством увеличения уровня адреналина.

Результаты исследования эффектов пептида EDR на медиаторный баланс старых крыс, подвергнутых ОСА, показывают, что у животных 4-й группы (пептид EDR + ОСА) выявлено накопление ДОФА и ДА в коре больших полушарий соответственно на 22% ($p \leq 0,05$) и 37% ($p \leq 0,05$) относительно 1-й группы. Тогда как в стволовых структурах крыс 4-й группы установлено увеличение содержания НА на 55% по сравнению с контролем (см. рис. 4.8). При этом изменение соотношений медиаторов обнаружено только в коре больших полушарий, где произошло снижение индекса НА/ДА на 27% ($p \leq 0,05$).

Относительно крыс 2-й группы (ОСА) у животных 4-й группы наблюдали накопление НА на 71% и снижение уровня адреналина на 37% ($p \leq 0,05$) в коре больших полушарий. Ранее уже было выдвинуто предположение, что в условиях ОСА, как модели нарушения мозгового кровообращения, данное перераспределение в содержании этих медиаторов в мозге может быть отражением энергосберегающего действия препарата.

В микромолярных концентрациях норадреналин выступает в качестве антиоксиданта, препятствуя развитию окислительного стресса, и, соответственно, угнетая каскад реакций, направленных на развитие процессов нейротоксичности и нейрональной гибели.

Это также косвенно можно объяснить повышением в коре больших полушарий крыс индексов НА/ДА и ДОФА/ДА 4-й группы на 103% ($p \leq 0,05$) и 22% ($p \leq 0,05$) соответственно, а также снижением соотношения ДОФА/ДА в стволовых структурах на 30% ($p \leq 0,05$) по сравнению со 2-й группой (ОСА). Относительно ложноотрицательных крыс, которым вводили пептид EDR, у животных 4-й группы (пептид EDR + ОСА) установлены изменения только в коре больших полушарий: содержание адреналина было ниже на 18% ($p \leq 0,05$), а ДОФА – выше на 24% ($p \leq 0,05$). Предположительно в основе этих изменений лежит активация процесса гидроксирования тирозина при участии тирозингидроксилазы, продуктом реакции которой является ДОФА. Это происходит после того, как выделение катехоламинов сменяется уменьшением их концентрации в нервных терминалях, следовательно, уменьшением аллостерического ингибирования тирозингидроксилазы продуктом синтеза. Действительно, у крыс 4-й группы установлено возрастание индекса ДОФА/ДА на 26% ($p \leq 0,05$) в коре больших полушарий относительно животных 3-й группы (ложноотрицательные + пептид EDR).

Таким образом, введение пептида EDR способствует возрастанию содержания адренергических нейромедиаторов: в коре больших полушарий – ДОФА и дофамина, в стволовых структурах – адреналина.

4.3. Оценка защитных свойств пептида EDR в модели острой и пренатальной гипобарической гипоксии

4.3.1. Влияние пептида EDR на активность и уровень активной каспазы-3 в мозге и обучаемость у крыс разного возраста при гипобарической гипоксии

К настоящему времени накоплено большое количество данных о роли экзогенных и эндогенных механизмов устойчивости мозга к стрессовым факторам, в том числе выявлены функциональные особенности разных нейрохимических систем (медиаторных, ферментативных, свободнорадикальных, протеолитических и т. д.) у особей с разным уровнем устойчивости к стрессу. Несмотря на то что все эти вопросы широко исследуются, до сих пор нет цельного представления как об индивидуально-типологических и популя-

ционных, так и онтогенетических механизмах резистентности мозга к ишемии/гипоксии. В частности, большой интерес представляет проблема нейрональной пластичности, а также вопрос о роли протеолитического фермента каспазы-3 в обеспечении нейрональной пластичности и реализации когнитивных функций в онтогенезе крыс в норме, условиях ишемии/гипоксии, а также введения пептидных препаратов. В связи с этим вопросы, связанные с изучением различных механизмов толерантности мозга к гипоксии, являются актуальными. Особое внимание уделяется препаратам, обладающим общесистемными адаптогенными свойствами, к которым относят и короткие пептиды, в том числе пептид EDR.

В исследовании использованы 21-суточные крысы ($n = 72$); половозрелые беспородные крысы-самцы в возрасте 3–4 месяцев массой 250–350 г ($n = 72$); 18-месячные крысы-самцы ($n = 68$); беременные беспородные крысы (180–200 г) с 21–22-дневным циклом гестации ($n = 16$). Срок беременности самок крыс определяли, считая со дня обнаружения спермиев в вагинальной мазке. Все эксперименты с животными были выполнены в соответствии с этическими принципами и нормативными документами, рекомендованными Европейским научным фондом и декларацией о гуманном отношении к животным. После совокупления через 6–8 часов осуществляли цитологическое исследование содержимого влагалища, и беременных крыс изолировали. С целью выявления факторов устойчивости к гипоксии мозга исследовано ее влияние на выживаемость, латентное обучение, а также активность/содержание каспазы-3.

Известно, что каспаза-3 участвует не только в реализации апоптоза, но и во многих стадиях клеточного цикла и в процессах пролиферации. Недавние работы расширили представления о роли каспазы-3 в адаптационных реакциях в ЦНС. Каспаза-3 является наиболее представленной цистеиновой протеазой в мозге и играет ключевую роль в синаптической пластичности благодаря участию в регуляции ряда сигнальных систем мозга, отвечающих за установление межнейронных связей, что важно для реализации адаптивных реакций на процесс старения.

В качестве моделей гипоксии мозга использовали пренатальную гипобарическую гипоксию и острую гипобарическую гипоксию. Гипобарическую гипоксию моделировали путем помещения беременных самок в приточно-вытяжную барокамеру при 66,41 кПа (3500 м над уровнем моря) на 3 часа. Воздействие производили с 13 по 20 (предплодный и плодный периоды) день беременности. Острую гипобарическую гипоксию проводили 3–4-месячным и 18-месячным животным в том же режиме. При исследовании механизмов пептидной регуляции функций нервной системы использовали

пептид EDR. Препарат вводили внутривентриально в течение 5 суток до воздействия (у 3–4-месячных животных и 18-месячных крыс) или в течение всей беременности самок (при исследовании эффектов пренатальной гипоксии) в дозировке 10 мкг/кг массы тела. Латентное обучение исследовали в лабиринте Морриса. Проводили изучение времени поиска скрытой платформы на 1-е–3-и сутки эксперимента. Активность каспазы-3 определяли в структурах головного мозга флуориметрическим методом. Содержание активной каспазы-3 находили методом иммуноферментного анализа.

Согласно полученным результатам исследования показателя выживаемости крыс, перенесших гипоксическое воздействие, установлено, что в модели пренатальной гипобарической гипоксии процент гибели новорожденных крыс составил 20%. В модели острой гипобарической гипоксии процент гибели 3–4-месячных крыс составил 37,5%, а в группе 18-месячных крыс – 43,3%. У животных, перенесших пренатальную ГГ, наблюдали высокое значение времени поиска скрытой платформы на 1-й день тестирования в лабиринте Морриса среди всех животных. К 3-му дню тестирования у этих крыс данный показатель становился еще выше (табл. 4.4). То есть обучения (закрепления навыка поиска скрытой платформы) не происходило.

При введении пептида EDR в течение всей беременности и моделировании гипобарической гипоксии у 21-дневных крыс активность каспазы-3 была ниже контрольного уровня в структурах мозга, но повышено ее содержание в коре больших полушарий на 161% ($p < 0,01$) относительно контроля (табл. 4.5).

Поиск связи между обучением и активностью каспазы-3 представляет большой интерес. Установлено, что в мозге 21-дневных крыс, перенесших пренатальную гипобарическую гипоксию, выявлено возрастание активности каспазы-3 относительно контроля (табл. 4.6).

При изучении эффектов гипобарической гипоксии на латентное обучение 3–4-месячных крыс установлено снижение времени поиска скрытой платформы к 3-м суткам тестирования. Однако по сравнению с контрольной группой обучение крыс было менее эффективно: в течение всего тестирования показано повышение времени поиска скрытой платформы у животных, которым моделировали острую гипобарическую гипоксию относительно контроля (см. табл. 4.4). Также следует отметить, что у 3–4-месячных крыс время поиска скрытой платформы было ниже, чем у 21-дневных крыс, подвергнутых пренатальной гипобарической гипоксии. При этом у 3–4-месячных крыс в модели острой гипобарической гипоксии происходило изменение активности каспазы-3 только

Таблица 4.4

**Результаты исследования когнитивной функции крыс разного возраста
в водном лабиринте Морриса в моделях гипоксии, с, М ± m**

Сумма четырех попыток	Первый день тестирования	Второй день тестирования	Третий день тестирования
21-дневные крысы			
Контроль			
(n = 72)	38,5 ± 4,1	21,3 ± 2,1	18,7 ± 1,7*
ГГ (13–20-й день беременности)			
(n = 60)	109,5 ± 15,8 #	106,4 ± 15,7 #	121,9 ± 19,0 #
Пептид EDR			
(n = 32)	38,3 ± 5,9	23,3 ± 4,9*	13,7 ± 1,8*, #
Пептид EDR + ГГ 13–20-й день беременности			
(n = 80)	41,8 ± 3,2 •	32,3 ± 1,8 # •	14,2 ± 1,2*, •
3–4-месячные крысы			
Контроль			
(n = 72)	28,5 ± 1,1	11,6 ± 0,3	8,5 ± 0,3
Острая гипоксическая гипоксия			
(n = 28)	37,5 ± 1,5*	24,5 ± 0,1*	17,8 ± 0,7*
Пептид EDR			
(n = 32)	23,5 ± 1,1	9,3 ± 0,4*	5,8 ± 0,2*, #
Пептид EDR + острая гипоксическая гипоксия			
(n = 80)	26,4 ± 1,2	28,1 ± 1,8 #	9,2 ± 0,5*
18-месячные крысы			
Контроль			
(n = 32)	34,8 ± 1,1	5,3 ± 0,2*	9,2 ± 0,4*
Острая гипоксическая гипоксия			
(n = 32)	43,0 ± 2,0 #	15,0 ± 0,7*, #	16,7 ± 0,7*, #
Пептид EDR			
(n = 32)	47,4 ± 2,3 #	23,9 ± 1,1*, #, •	9,5 ± 0,4*, •
Пептид EDR + острая гипоксическая гипоксия (n = 8)			
(n = 32)	56,8 ± 2,4 #, •	30,9 ± 1,5*, #, •	7,3 ± 0,3*, #, •

Примечание: * – $p < 0,05$ достоверное снижение времени поиска платформы относительно 1-го дня тестирования; # – $p < 0,05$ достоверные отличия показателей относительно контроля; • – $p < 0,05$ достоверные отличия показателей относительно группы крыс в модели гипоксического воздействия.

**Активность каспазы-3 в структурах мозга крыс разного возраста
в моделях гипоксии и введения пептида EDR, $M \pm m$**

Группа / воздействие	Кора больших полушарий	Стволовые структуры
21-дневные крысы		
Контроль	2,6 ± 0,1	3,5 ± 0,4
ГГ 13–20 сутки беременности	3,1 ± 0,2*	4,4 ± 0,2
Пептид EDR	1,1 ± 0,1*	1,7 ± 0,12*
ГГ 13–20-й день беременности + пептид EDR	2,1 ± 0,1*	2,6 ± 0,1*
3–4-месячные крысы		
Контроль	3,9 ± 0,3	2,85 ± 0,16
ОГГ	4,3 ± 0,3	4,52 ± 0,24*
Пептид EDR	3,8 ± 0,1	3,68 ± 0,14*
Пептид EDR + ОГГ	3,2 ± 0,2	2,58 ± 0,11
18-месячные крысы		
Контроль	0,8 ± 0,04	1,0 ± 0,1
ОГГ	1,9 ± 0,06*	1,9 ± 0,3*
Пептид EDR	1,2 ± 0,1*	1,3 ± 0,1*
Пептид EDR + ОГГ	1,0 ± 0,1	1,4 ± 0,4*

Примечание: * – $p < 0,05$ достоверное изменение активности каспазы-3 относительно контроля.

в стволовых структурах мозга; содержание активной каспазы-3 не выявлено относительно контроля (табл. 4.5, 4.6).

При введении пептида EDR у 3–4-месячных крыс происходило повышение активности каспазы-3 в стволовых структурах ($p < 0,05$) и содержания активной каспазы-3 в коре больших полушарий ($p < 0,05$) и стволовых структурах ($p < 0,05$). Введение пептида EDR перед острой гипобарической гипоксией способствовало тому, что значения активности и содержания активной каспазы-3 в мозге соответствовали контрольному уровню. Таким образом, с возрастом происходит изменение активности каспазы-3 в мозге, что, вероятно, определяет возрастные различия в реагировании организма на введение пептида EDR.

В контрольной группе 18-месячных крыс время поиска скрытой платформы в 1-й день эксперимента было на 22% ($p < 0,05$) выше, но на 2-й день тестирования – ниже на 54% ($p < 0,05$) уровня 3–4-месячных крыс контрольной группы. К 3-му дню эксперимента данный показатель у крыс разного возраста контрольных

групп (3–4- и 18-месячных) не различался. Введение пептида EDR 18-месячным крысам способствовало повышению времени поиска скрытой платформы на 1-й день эксперимента относительно контрольной группы 18-месячных животных, но к 3-м суткам данный показатель не различался в этих группах.

Еще более значительное повышение времени поиска скрытой платформы относительно контроля на 1–2-й день эксперимента выявлено в группе 18-месячных животных, в модели введения пептида EDR перед острой гипобарической гипоксией (табл. 4.4). После острой гипобарической гипоксии у 18-месячных крыс значительно возростала активность каспазы-3 и в коре больших полушарий, и в стволовых структурах, однако в то же время содержание данной протеазы не изменилось относительно контроля (см. табл. 4.5, 4.6). В головном мозге крыс 18-месячного возраста в модели острой гипобарической гипоксии (ОГГ) и предварительного введения пептида EDR выявлены выраженные региональные

Таблица 4.6

Содержание активной каспазы-3 (нг/г ткани) в мозге крыс разного возраста в моделях гипоксии и введения пептида EDR, $M \pm m$

Группа / воздействие	Кора больших полушарий	Стволовые структуры
21-дневные крысы		
Контроль	11,3 ± 0,08	13,5 ± 0,6
ГГ 13–20 сутки беременности	14,6 ± 0,47	16,5 ± 0,6
Пептид EDR	17,3 ± 0,70*	19,4 ± 0,9*
Пептид EDR + ГГ 13–20-й день беременности	29,6 ± 1,31*	14,7 ± 0,7
3–4-месячные крысы		
Контроль	10,1 ± 0,4	12,0 ± 0,5
ОГГ	11,8 ± 0,5	12,1 ± 0,6
Пептид EDR	13,5 ± 0,6*	16,7 ± 0,7*
Пептид EDR + ОГГ	12,0 ± 0,5	15,5 ± 0,7
18-месячные крысы		
Содержание каспазы-3		
Контроль	8,8 ± 0,3	8,9 ± 0,4
ОГГ	8,5 ± 0,4	9,4 ± 0,5
Пептид EDR	12,6 ± 0,6*	13,6 ± 0,6*
Пептид EDR + ОГГ	12,4 ± 0,6*	13,2 ± 0,5*

Примечание: * – $p < 0,05$ достоверные отличия показателей относительно контрольного уровня.

особенности активации каспазы-3. После ОГГ происходило значительное повышение активности фермента как в коре (на 131%, $p < 0,001$), так и в стволовых структурах (на 82%, $p < 0,01$) мозга. Однако на содержание активной каспазы-3 ОГГ не влияла. Введение пептида EDR вызывало повышение каспазной активности в коре больших полушарий и стволовых структурах мозга 18-месячных животных на 34% и 27% ($p < 0,05$) соответственно. Введение пептида EDR перед ОГГ способствовало снижению активности фермента в коре больших полушарий на 48% ($p < 0,05$), а в стволовых структурах – на 24% ($p < 0,05$) относительно группы животных в модели ОГГ. Однако в стволовых структурах активность каспазы-3 была выше (на 38%, $p < 0,05$), чем в контроле. Но, принимая тот факт, что пептид EDR способствовал значительному увеличению выживаемости животных у 18-месячных крыс после ОГГ, можно предполагать, что умеренная активация каспазы-3 в стволовых структурах мозга является отражением пластических перестроек, направленных на повышение адаптационных реакций организма в ответ на стрессорное воздействие. Введение пептида EDR 18-месячным крысам способствует также повышению экспрессии каспазы-3 в структурах мозга в модели гипобарической гипоксии (в отличие от 21-дневных и 3–4-месячных животных).

Выявленные эффекты пептида EDR на латентное обучение крыс разного возраста можно объяснить связанными с возрастом изменениями протеазной активности в структурах мозга животных. В моделях гипобарической гипоксии предварительное введение пептида EDR способствует снижению эффектов стрессового фактора на протеолитическую активность и содержание активной каспазы-3, тем самым улучшая показатели латентного обучения животных разного возраста.

Мы предполагаем, что эффекты пептида EDR связаны с его аминокислотным составом (Glu-Asp-Arg), который близок к составу RGD-последовательности каспазы-3 (аргинин-глицин-аспартат) вблизи активного ее центра. Данная последовательность вовлечена во внутримолекулярное взаимодействие, придающее молекуле профермента конформацию, при которой протеазная активность снижена. Также известно, что аргинин-содержащие пептиды, к которым относится пептид EDR, минимизируют проявления окислительного стресса и активируют систему «синтаза оксида азота – оксид азота», таким образом снижая вероятность развития нейровоспалительных процессов. С другой стороны, поскольку с возрастом происходит снижение активности каспазы-3 в мозге, повышение активности каспазы-3 в стволовых структурах под влиянием пептида EDR может

свидетельствовать об активации процесса нейрогенеза у старых крыс относительно контрольной группы животных того же возраста.

Как известно, субстратом для каспазы-3 служит множество белков цитоскелета (ламинин, G-актин, фодрин, пресенилин), ферменты репарации ДНК и регуляторы клеточного цикла (PARP, pRb), протеин-киназы (MEKK 1, FAK, PAK 2) – так называемые «субстраты смерти», а также белков ацетилхолинергических рецепторов. Повышение/снижение активности каспазы-3 под влиянием введения пептидных препаратов и воздействия стрессового фактора приводят к определенным изменениям потенциал-зависимых каналов рецепторов. Это, в свою очередь, влияет на процесс консолидации следа памяти. По другим данным начальный этап формирования долговременной памяти инициирует значимое возрастание активности апоптоза в гиппокампе. Упрочение долговременной пространственной памяти ассоциировано с достоверными изменениями показателей дифференцировки и запрограммированной гибели вновь образованных клеток в префронтальной коре. Например, введение ингибитора каспазы-3 в мозг крыс в период ее естественной активации в гиппокампе (18-й день) приводит к отдаленным нарушениям обучения реакции активного избегания.

Таким образом, нарушения развития поведения могут быть связаны с изменениями синаптической пластичности в результате временного блокирования (в условиях стресса) или связанного с возрастными изменениями экспрессии и/или активности каспазы-3.

4.3.2. Влияние пептида EDR на поведенческие реакции, показатели антиоксидантной системы беременных самок крыс, подвергнутых воздействию острой гипобарической гипоксии, а также на поведенческие реакции их потомства

Исследование было проведено на 10 беспородных беременных самках крыс, которые были подвергнуты гипобарической гипоксии на 10-й день беременности – в срок, при котором у потомства происходит закладывание нервной системы. Острую гипобарическую гипоксию инициировали, создавая в проточной барокамере разрежение, соответствующее остаточному давлению 0,125 атм. После получения потомства самки крыс были декапитированы. При декапитации у крыс были изолированы ткани мозга и печени, в которых определяли активность основных антиоксидантных ферментов: супероксиддисмутазы с использованием системы, обеспечивающей восстановление нитросиногетероцикла, и глутатионпероксидазы в ферментативной реакции расщепления

гидроперекиси третичного бутила. Потомство, полученное от самок крыс, перенесших гипобарическую гипоксию, было исследовано с помощью физиологических тестов.

Физиологические тесты представляли собой тестирование в «открытом поле» потомства, перенесшего пренатальную гипоксию, в возрасте 4 недели. При этом в течение 3 минут поминутно регистрировали следующие параметры: горизонтальную активность животных — количество пересеченных квадратов; вертикальную активность — количество стоек; исследовательскую активность — количество обследованных норок; число эпизодов груминга; выход в центр поля; количество болюсов, характеризующие тревожность и эмоциональную активность животных.

Эффект гипоксического воздействия проявлялся следующим образом. Беременные крысы по чувствительности к гипоксии были разделены на две группы. Крысы 1-й группы характеризовались высокой чувствительностью к гипоксии, что проявлялось в остановке дыхания через 61–285 с после достижения заданного остаточного давления в барокамере. 2-я группа была представлена устойчивыми к гипоксии животными, сохранявшими дыхательную активность в барокамере на протяжении всего периода гипоксического воздействия. У чувствительных к гипоксии животных (1-я группа) наблюдалась также потеря позы продолжительностью 140–340 с. В ходе сеанса гипоксии у животных, устойчивых к гипоксии (2-я группа), потери позы не наблюдалось.

Заметный интерес представляют данные о влиянии пептида EDR на активность антиоксидантных ферментов в мозге и печени устойчивых и чувствительных к гипоксии крыс. Оказалось, что в ткани мозга устойчивых к гипоксии крыс активность супероксиддисмутазы и глутатионпероксидазы в 2 раза выше, чем у животных, чувствительных к гипоксии (рис. 4.9, А). В печени же подопытных животных такой разницы в активности антиоксидантных ферментов между двумя группами не отмечалось; это соответствует представлениям о том, что мозг наиболее подвержен гипоксическому воздействию. Вместе с тем полученные нами данные отчетливо показали, что введение чувствительным к гипоксии животным пептида EDR приводит к значительному повышению активности СОД в тканях мозга и печени (см. рис. 4.9), причем в мозговой ткани он достигает уровня, сопоставимого с таковым у животных, устойчивых к гипоксии. Активность ГП под влиянием пептида EDR возрастает только у крыс, чувствительных к гипоксии (рис. 4.9, А). Характерно, что пептид EDR не вызывает достоверных изменений в активности антиоксидантных ферментов в мозге и печени крыс, устойчивых к гипоксии (рис. 4.9, А и Б).

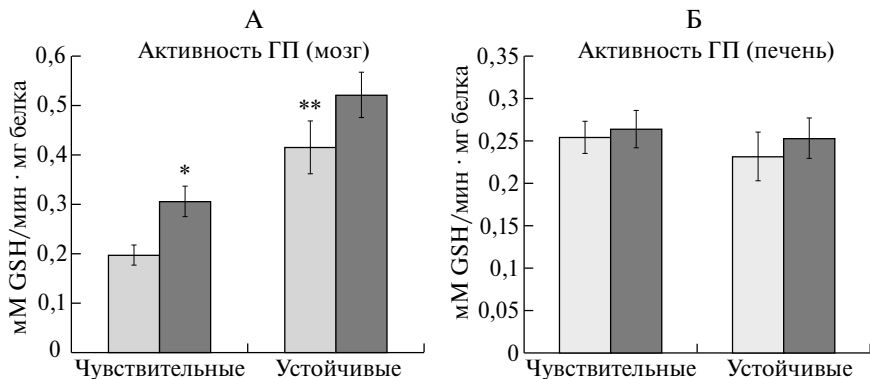


Рис. 4.9. Влияние пептида EDR на активность глутатионпероксидазы в мозгу (А) и печени (Б) чувствительных и устойчивых к гипоксии крыс: * – $p < 0,05$ отличия между животными, чувствительными к гипоксии (светлый столбик), и животными, чувствительными к гипоксии, получавшими пептид EDR (темный столбик); ** – $p < 0,01$ отличия между чувствительными и устойчивыми к гипоксии животными

Результаты исследования свидетельствуют о том, что у устойчивых к гипоксии крыс высокая активность наиболее значимых антиоксидантных ферментов СОД и ГП обеспечивает защиту от гипоксического воздействия и не нуждается в дополнительной стимуляции со стороны пептида EDR. По результатам гипоксического воздействия крыс разделили на контрольную и опытную группы, в каждой из которых были представлены как чувствительные, так и устойчивые к гипоксии крысы. Номера животных указаны в табл. 4.7. Животные контрольной группы (№№ 2, 7, 8, 10) получали внутривентриально инъекции физиологического раствора в течение 10 дней через день (всего 5 инъекций) из расчета 1 мл/кг массы тела. Животные подопытной группы (№№ 1, 4, 5, 6, 9) получали пептид EDR по такому же протоколу в дозе 10 мкг/кг массы тела при каждой инъекции. Объем раствора вводимого препарата соответствовал 1 мл/кг массы тела.

На 22–24-й день беременности в контрольной группе родили две из четырех самок, в подопытной группе – три из пяти. При этом количество потомства в помете у контрольных крыс было меньше, чем у крыс, получавших пептид EDR (см. табл. 4.7). В то же время количество потомства в группе опытных животных приближалось к нормальному физиологическому уровню, типичному для интактных животных (12–15 крысят в помете). Потомство, полученное от животных обеих групп, было исследовано далее с помощью физиологических тестов.

**Влияние гипобарической гипоксии на крыс,
находящихся во втором триместре беременности**

Номер животного	Длительность пребывания на высоте, с	Время восстановления позы, с	Время восстановления активности, с	Вводимое вещество	Кол-во животных в помете, шт.
Контрольная группа					
2	300	—	—	Натрия хлорид 0,9%	—
7	300	—	—		9
8	285	297	238		10
10	300	—	—		—
Опытная группа					
1	61	80	140	Пептид EDR	—
4	300	—	—		12
5	285	285	340		15
6	300	—	—		—
9	300	—	—		12

***Влияние пептида EDR на поведенческие реакции
потомства крыс, подвергнутых воздействию
пренатальной гипобарической гипоксии***

Достоверных результатов по влиянию пептида EDR на вертикальную и горизонтальную активность, а также различий в активности этих видов между потомством от чувствительных и устойчивых к гипоксии крыс найдено не было. Исследовательская активность (обследование норок) потомства крыс, устойчивых к гипоксии, а также потомства группы крыс, устойчивых к гипоксии и принимающих пептид EDR, достоверно выше, чем у чувствительных крыс контрольной группы (рис. 4.10). Однако пептид EDR не влиял на данный показатель, так как достоверных различий в активности потомства чувствительных крыс, получавших и не получавших пептид EDR, не найдено. Потомство животных, устойчивых к гипоксии, характеризовалось повышенной тревожностью и эмоциональностью, о чем свидетельствуют данные по грумингу (рис. 4.11) и количеству болюсов (рис. 4.12). На частоту груминга пептид EDR не оказывал влияния, однако выявлено статистически достоверное увеличение актов болюсов у потомства устойчивых к гипоксии крыс, находившихся под влиянием пептида EDR, по сравнению с потомством устойчивых к гипоксии крыс, не находившихся под влиянием пептида EDR (см. рис. 4.12).

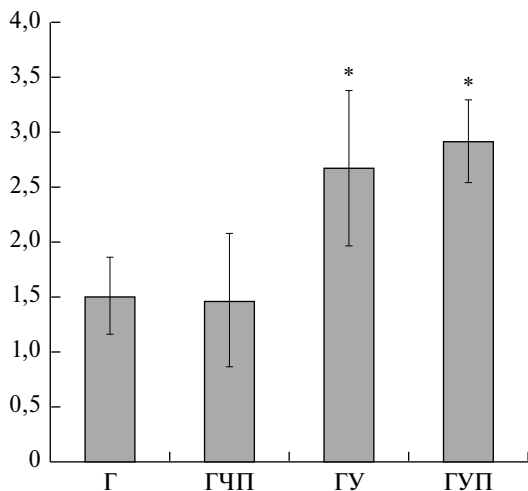


Рис. 4.10. Влияние пренатального введения пептида EDR на частоту обследования норок в тесте «открытое поле» у животных, рожденных от крыс, подвергшихся гипоксии. По оси ординат — количество обследованных норок. Здесь и на рис. 4.11, 4.12: Г — чувствительные к гипоксии крысы, контрольная группа; ГЧП — чувствительные к гипоксии крысы, получавшие пептид EDR; ГУ — устойчивые к гипоксии крысы; ГУП — устойчивые к гипоксии крысы, получавшие пептид EDR; * — $p < 0,05$ статистически достоверное отличие от данных контрольной группы

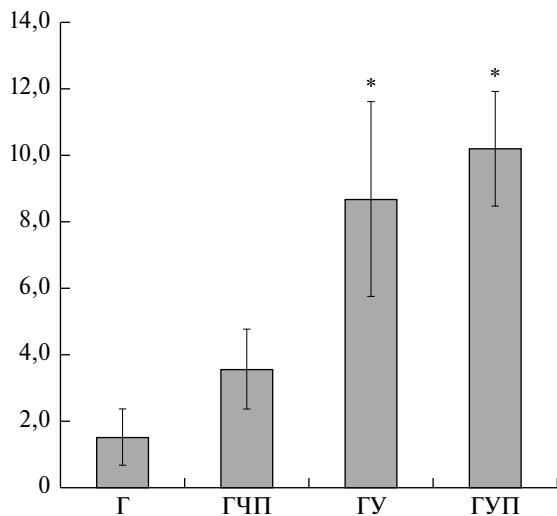


Рис. 4.11. Влияние пренатального введения пептида EDR на частоту груминга в тесте «открытое поле» у крысят, рожденных от крыс, подвергшихся гипоксии. По оси ординат — число эпизодов груминга; * — $p < 0,05$ статистически достоверное отличие от данных контрольной группы

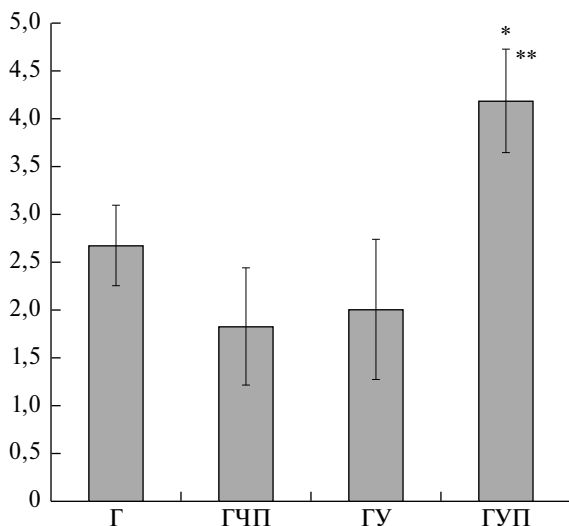


Рис. 4.12. Влияние пренатального введения пептида EDR на частоту актов дефекации (болюсы) в тесте «открытое поле» у животных, перенесших пренатальную гипоксию. По оси ординат — количество болюсов; */** — статистически достоверное отличие от данных контрольной группы ($p < 0,05$) / группы устойчивых к гипоксии крыс, не подверженных влиянию пептида EDR ($p < 0,05$)

4.4. Влияние пептида EDR на окислительный стресс, вызываемый в нейронах убаином или пероксидом водорода

В литературе обсуждаются 2 способа создания окислительного стресса у переживающих клеток — неспецифическое воздействие пероксидом водорода или специфическое воздействие, опосредованное рецепторами клеточной мембраны. Хотя оба вида стресса сопровождаются ростом свободных радикалов внутри клеток, только в первом случае накопление АФК сопровождается клеточной смертью. Из этого делается вывод, что рецептор-опосредованный рост свободных радикалов имеет для клеток адаптационное значение.

В данном разделе было исследовано влияние пептида EDR и N-ацетилкарнозина на уровень АФК и смертность гранулярных клеток мозжечка, вызванную пероксидом водорода и убаином, рецептором которого в нейронах является Na/K-насос.

Как видно на рис. 4.13, инкубация гранулярных клеток мозжечка с убаином индуцирует накопление свободных радикалов в клетках, причем этот рост не сопровождается клеточной смертью (рис. 4.14). Следовательно, накопление свободных радикалов в этих условиях имеет другое информационное значение.

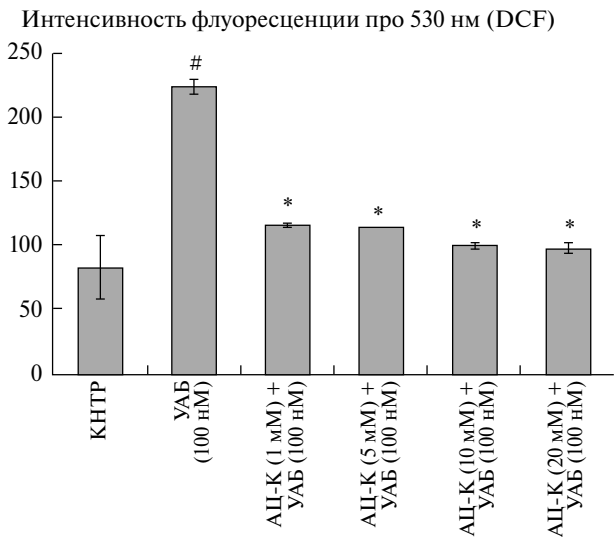


Рис. 4.13. Уабаин вызывает накопление АФК после 30 мин инкубации с нейронами мозжечка, а присутствие N-ацетилкарнозина ограничивает его эффект; # – $p < 0,05$ соответствует достоверности отличий от контроля, * – $p < 0,05$ – от уровня в присутствии уабаина. Сокращения: КНТР – контроль, УАБ – уабаин, АЦ-К – N-ацетилкарнозин

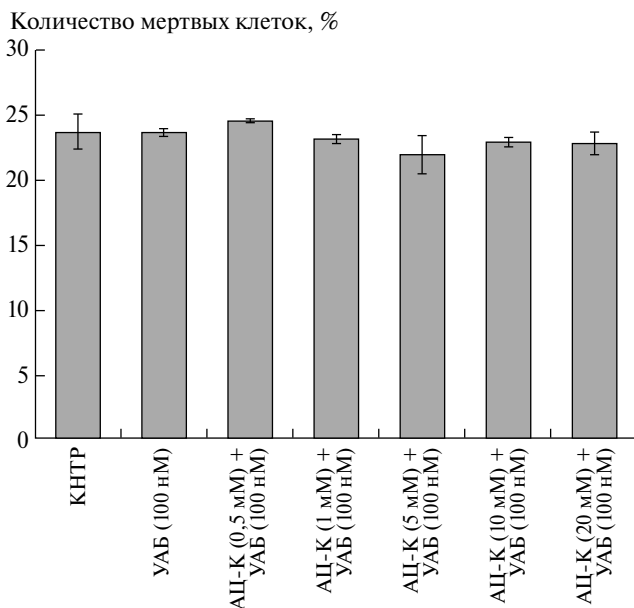


Рис. 4.14. Измерение доли мертвых нейронов в популяции гранулярных клеток мозжечка после их 30-мин инкубации в разных условиях. Сокращения как на рис. 4.13

Пептид EDR в этих условиях также вызывает снижение уровня АФК, увеличиваемое уабаином, эффект демонстрирует отчетливую дозовую зависимость (рис. 4.15).

В то же время на уровень радикалов, индуцируемый инкубацией клеток с пероксидом водорода, пептид EDR оказывает противоположное действие – он вызывает увеличение этого показателя (рис. 4.16).

Поскольку пептид EDR не способен непосредственно взаимодействовать с пероксидом водорода и не вызывает сам индукции свободных радикалов, обнаруженный эффект позволяет предполагать наличие у пептида EDR способности вызывать адаптационный ответ клеток, требующий специального исследования.

Интенсивность флуоресценции про 530 нм (DCF)

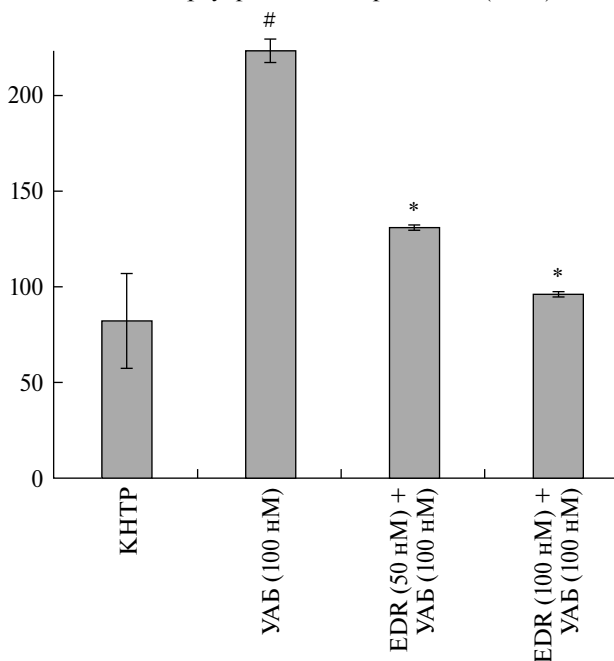


Рис. 4.15. Пептид EDR ограничивает накопление АФК в гранулярных клетках мозжечка, вызванное 30-мин инкубацией клеток с уабаином; # – $p < 0,05$ соответствует достоверности отличий от контроля, * – $p < 0,05$ – от уровня в присутствии уабаина. Сокращения: КНТР – контроль, УАБ – уабаин, EDR – пептид

Интенсивность флуоресценции про 530 нм (DCF)

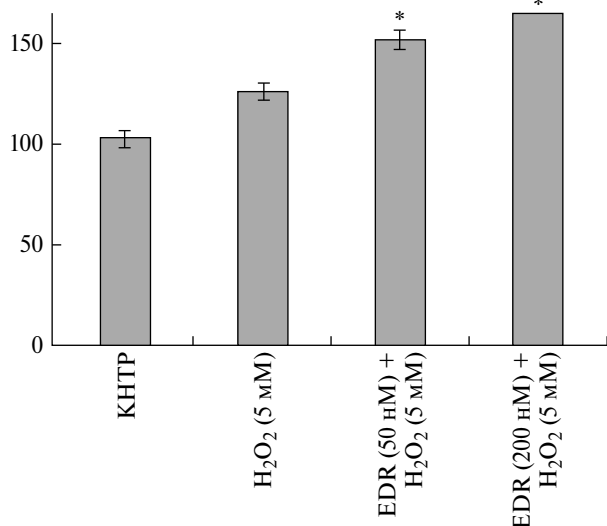


Рис. 4.16. Пептид EDR увеличивает сигнал свободных радикалов, вызываемый 30-мин инкубацией нейронов с пероксидом водорода; * – $p < 0,05$ соответствует достоверности отличий от уровня в присутствии уабаина. Со-кращения как на рис. 4.15

4.5. Участие пептида EDR во внутриклеточных сигнальных механизмах

Стратегия в вопросе о том, какие гены должны быть экспрессированы – гены адаптации или гены клеточной смерти, по-видимому, определяется временным профилем активации MAP-киназы. Как нами недавно было показано, активация одних и тех же рецепторов NMDA-класса разными лигандами приводит к различному профилю активации одного из центральных компонентов MAP-киназного комплекса – ERK 1/2.

Переживающую культуру получали из клеток мозжечка крыс, которая характеризовалась чистотой 95–98%. Полученные нейроны инкубировали требуемое время с различными лигандами в присутствии глицина, ко-агониста NMDA-рецепторов. Затем производили электрофорез полученных нами лизатов в полиакриламидном геле в течение 40 минут.

Исследование активации MAP-киназы или отдельных компонентов MAP-киназного семейства проводили с помощью вестерн-блот анализа.

Активность ERK 1/2 оценивали по соотношению фосфорилированной формы к эндогенному контролю, в качестве которого

использовали общее содержание актина в клетках. Содержание обеих форм определяли методом Western blotting.

По предварительным результатам видно, что активация рецепторов N-метил-D-аспартатом (NMDA) приводит к кратковременной активации ERK 1/2, в то время как гомоцистеин вызывает длящийся во времени активационный сигнал (рис. 4.17).

Следовательно, важным является не только присутствие лиганда, но и характер вызываемой им активации MAP-киназы. Поэтому в настоящем разделе мы подвергли исследованию влияния пептида EDR на ГЦК-индуцируемый сигнал, выражающийся в активации MAP-киназы.

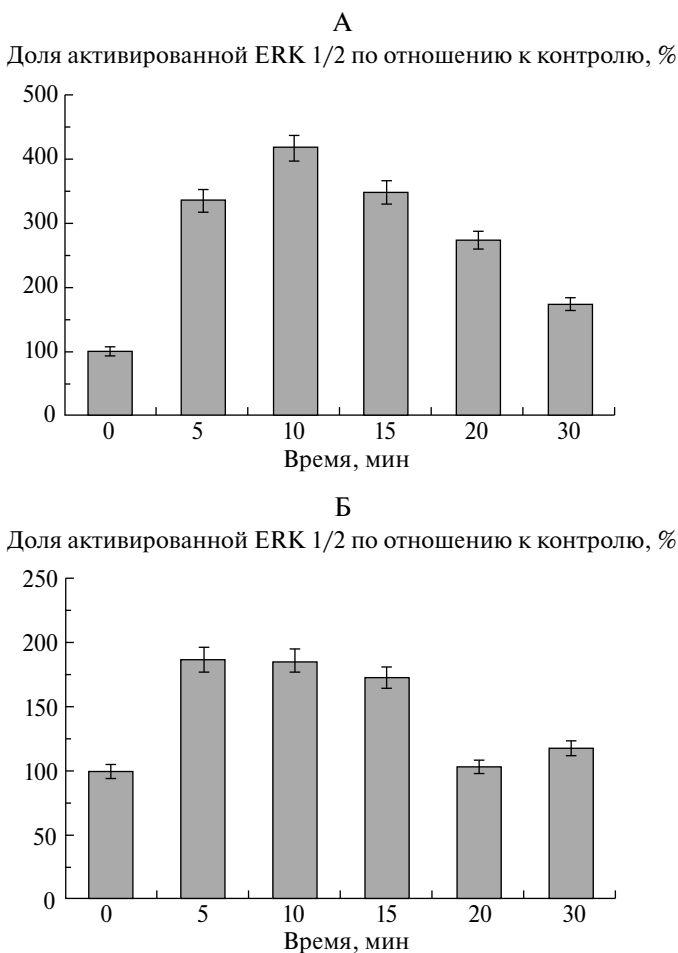


Рис. 4.17. Временной профиль активации ERK 1/2 киназы в нейронах, активируемых NMDA (0,5 мМ, А) или ГЦК (0,5 мМ, Б)

На рис. 4.18 представлен блот ряда проб, отражающих активацию ERK 1/2 киназы в нейронах, инкубируемых в разных условиях. Видно, что доля активированных молекул фермента в клетках, инкубированных в разных условиях, различна. В частности, гомоцистеин и NMDA уже через 10 минут инкубации увеличивают долю фосфорформы фермента (т. е. активируют его).

В этих условиях мы предприняли исследование временной зависимости (временного профиля активации) ERK 1/2 киназы нейрональных клеток. Оказалось (рис. 4.19), что в отличие от NMDA (рис. 4.17, А), ГЦ обеспечивает более продолжительную активацию

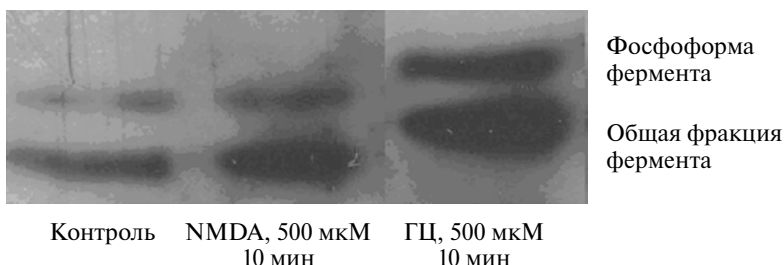
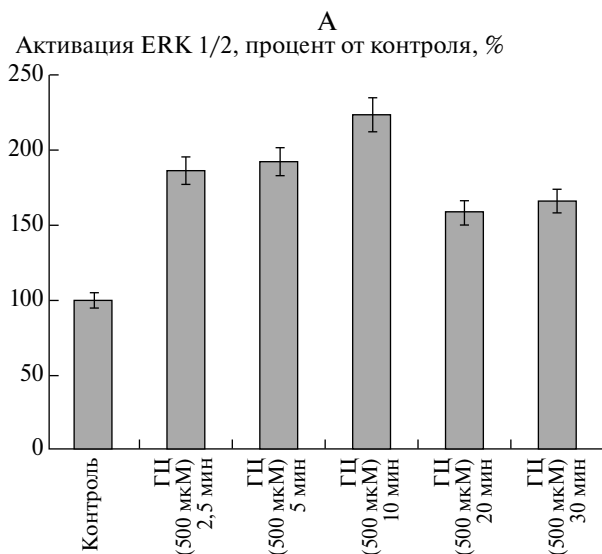


Рис. 4.18. Иммуноблотинг ERK 1/2 киназы в культуре нейрональных клеток, определяющий долю фосфорилированных (активированных) молекул из общего их числа



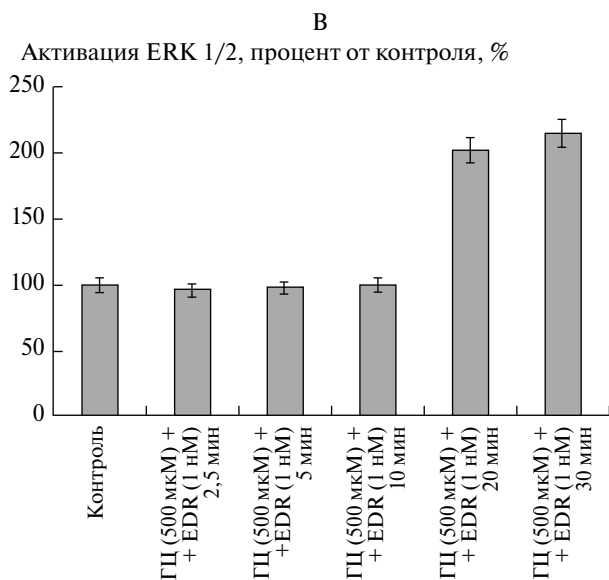
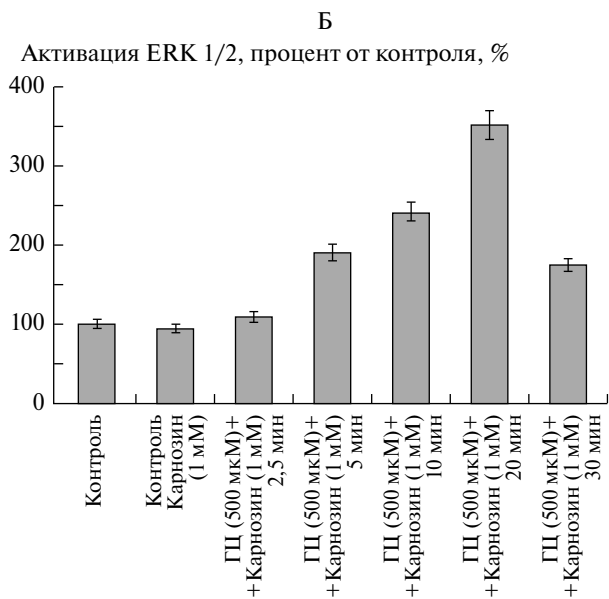


Рис. 4.19. Временной профиль активации ERK 1/2 киназы гомоцистеином без добавок активаторов (А) и в присутствии карнозина (Б) или пептида EDR (В)

ERK 1/2, и временной профиль активации аналогичен тому, что было показано ранее для ГЦК (рис. 4.17, Б). В присутствии карнозина и пептида EDR лаг-период активации киназы удлиняется, что можно рассматривать, как защитный эффект от токсического действия гомоцистеина. При этом пептид EDR демонстрирует на несколько порядков большую эффективность, чем карнозин.

4.6. Влияние пептида EDR и других биологически активных соединений на клеточный цикл

Клеточный цикл эукариот состоит из двух периодов: периода клеточного роста, называемого «интерфаза», во время которого идет синтез ДНК и белков и осуществляется подготовка к делению клетки; и периода клеточного деления, называемого «фаза М». Интерфаза состоит из нескольких периодов: G₁-фазы (от англ. *gap* – промежуток), или фазы начального роста, во время которой идет синтез мРНК, белков и других клеточных компонентов; S-фазы (от англ. *synthesis* – синтетическая), во время которой идет репликация ДНК клеточного ядра, также происходит удвоение центриолей (если они есть); G₂-фазы, во время которой идет подготовка к митозу.

Влияние исследуемых веществ на распределение клеток по стадиям цикла в культуре нейробластомы мыши представлено на рис. 4.20.

Работа со злокачественными клетками осложнена тем, что они зачастую представляют размытую картину распределения клеток по фазам цикла – это видно при сравнении. Вероятно, одной из причин этого является подверженность клеточной ДНК окислительным повреждениям. Во всяком случае, такие антиоксиданты, как N-ацетилцистеин, проникающий через клеточную мембрану и не вызывающий гибели клеток в умеренных концентрациях (до 10 мМ), делают картину распределения клеток по фазам цикла более четкой, как это видно при сравнении рис. 4.20, А и Б.

Аналогичным образом действуют и карнозин (10 мМ, рис. 4.20, В) и пептид EDR (1 мкМ, рис. 4.20, Г). Однако данные, полученные на этой культуре клеток, из-за нечетких границ пиков плохо поддаются количественному анализу. Более четкий количественный анализ был сделан на культуре нейробластомы человека SK-N-SH.

Таким образом, для исследования влияния пептида EDR на процентное распределение клеток нейробластомы человека SK-S-N по стадиям цикла культуру содержали на среде ДМЕМ,

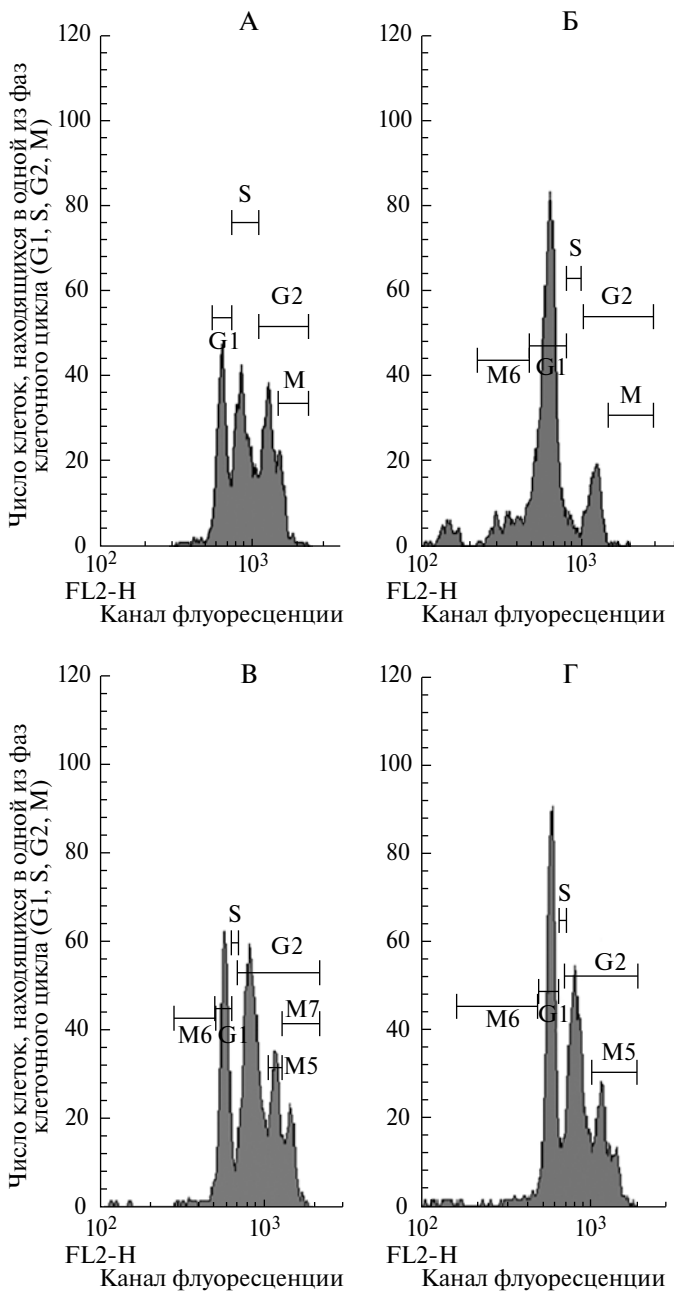


Рис. 4.20. Влияние N-ацетилцистеина, карнозина и пептида EDR на распределение клеток по стадиям цикла в культуре нейробластомы мыши N-18: А – контроль; Б – 10 мМ N-ацетилцистеина; В – 10 мМ карнозина; Г – 1 мкМ пептида EDR

содержащей 10% эмбриональной сыворотки и незаменимые аминокислоты. При подготовке к опыту клетки рассаживали в 6-луночные планшеты со средой MEM+2% сыворотки. MEM, как среда менее богатая аминокислотами и другими добавками, создает худшие условия для выживаемости клеток, и ее выгодно использовать для выявления эффектов возможных стимуляторов клеточной пролиферации. Кроме того, некоторые компоненты DMEM снижают эффективность действия карнозина.

К клеткам добавляли пептид EDR в концентрациях 1, 2, и 10 мкМ и инкубировали 2 дня. Результаты исследования влияния пептида EDR на процентное распределение клеток нейробластомы человека SK-S-N изображены на рис. 4.21 (см. на вклейке).

Оказалось, что через 2 дня в пробах, содержащих 10 мкМ пептида EDR, наблюдалась выраженная гибель клеток. При этом в пробах с 1 мкМ и 2 мкМ пептида EDR количество клеток было таким же, как в среде с DMEM.

Использование среды MEM позволило выявить защитный эффект пептида EDR в концентрациях 1 мкМ и 2 мкМ, который препятствовал гибели клеток. Кроме того, выяснилось, что пептид EDR специфически влиял на клеточный цикл: в его присутствии снижались пики sub-G1 и G1, но возрастал пик G2 (см. рис. 4.21). Таким образом, пептид EDR в концентрации 1–2 мкМ снижает гибель клеток в неблагоприятных для них условиях (отсутствие аминокислот, недостаток сыворотки), как это следует из снижения пика sub-G1, характеризующего индукцию апоптоза.

Более того, пептид EDR стимулирует пролиферацию клеток, как это следует из увеличения количества клеток в фазе G2, который правильнее называть G2/M (M – митоз, в этом пике увеличивается количество митотических клеток). Этот эффект пептида EDR на клеточный цикл является непосредственным отражением его регулирующего действия на ключевой компонент семейства MAP-киназ – ERK 1/2 киназу.

Аналогичные результаты получены при инкубации клеток PC12 с N-ацетилцистеином, карнозином и пептидом EDR (рис. 4.22, см. на вклейке). В этих условиях N-ацетилцистеин использовался как соединение, предотвращающее развитие апоптоза. Сравнение показало, что как и N-ацетилцистеин, карнозин препятствует включению программы апоптоза, хотя и в меньшей степени. Действие обоих соединений проявляется при весьма высоких концентрациях (20 мМ).

Пептид EDR частично предотвращал развитие апоптоза уже при 200 нМ, т.е. при концентрациях, на 4 порядка меньших, чем карнозин. При этом величина их эффектов была сравнима

(см. рис. 4.22). В проведенном исследовании при сопоставлении эффективности карнозина, мексидола, SkQ1 и пептида EDR в процессе защиты липопротеинов сыворотки крови доноров было установлено, что $K_{0,5}$ для карнозина и мексидола лежит в области 0,5–1 мМ, а SkQ1 – 50–100 нМ. $K_{0,5}$ для пептида EDR находится посередине между этими значениями – 100–500 мкМ. При использовании клеток (нейтрофилов, тимоцитов и нейронов) пептид EDR эффективен при гораздо меньших концентрациях (100–200 нМ). Другими словами, наличие специальных сигнальных путей клетки открывает для пептида EDR возможность выступать в качестве не только прямого антиоксиданта, но и специфического регулятора. При этом его регуляторная роль проявляется в концентрациях, на несколько порядков меньших, чем прямой антиоксидантный эффект.

Следовательно, в механизмах внутриклеточной сигнализации мы можем предсказать наличие реакций с высокой чувствительностью к пептиду EDR. Одной из таких реакций может быть активация ERK 1/2 киназы – фермента, участвующего в передаче сигналов от глутаматных рецепторов NMDA-класса к ядерному аппарату клетки.

В предварительном исследовании мы выяснили, что активация этих рецепторов приводит к стимуляции ERK 1/2 киназы, развивающейся во времени различными путями, в зависимости от того, какой лиганд активирует NMDA-рецепторы – NMDA или гомоцистеин (гомоцистеиновая кислота): в первом случае наступает кратковременная активация с последующим спадом активности (невзирая на длящуюся активацию рецепторов), во втором случае – длительная активация, присущая эксайтотоксическому пути, приводящему к активации генов клеточной смерти и гибели клеток.

В этих условиях нами показано, что и карнозин, и пептид EDR препятствуют активации ERK 1/2 киназы гомоцистеином и смерти клеток, причем пептид EDR действует и более эффективно, и при гораздо меньших концентрациях.

Эти данные служат непосредственным указанием на специфическое вмешательство пептида EDR в механизмы внутриклеточного сигналинга, что обращает внимание на возможное действие пептида EDR на состояние клеточного цикла. Это предположение было проверено на культурах нейробластомы и феохромоцитомы PC12. Оказалось, что карнозин и его ацетилированное производное N-ацетилкарнозин, а также пептид EDR упорядочивают картину клеточного цикла таким же образом, как это делает N-ацетилцистеин. Однако пептид EDR, в отличие от всех остальных моди-

фикаторов клеточного цикла, проявляет эффективность в гораздо меньших концентрациях (200 нМ–1 мкМ), т. е. в тех, которым не свойственно прямое антиоксидантное действие. Это обстоятельство подчеркивает, что механизм действия карнозина и N-ацетилцистеина отличны от механизма действия пептида EDR, для которого мы постулируем его прямое специфическое влияние на клеточный геном. При этом эффективные концентрации пептида EDR находятся в пределах его физиологических концентраций.

Таким образом, при изучении защитного действия пептида EDR мы получили результаты, которые демонстрируют его способность защищать от окислительного стресса клетки как нервной (нейроны), так и иммунной (тимоциты, нейтрофилы) систем. Полученные результаты внесут безусловный вклад в преодоление последствий конфликтной беременности, протекающей в условиях окислительного стресса. Можно прогнозировать, что использование пептида EDR при осложнениях беременности, индуцируемых или сопровождающихся гипергомоцистеинемией, благоприятно отразится на состоянии будущего организма, пренатальное развитие которого протекает в условиях окислительного стресса.

Заключение

Установлено, что пептид EDR обладает антиоксидантным действием, которое выражается в снижении синтеза АФК и повышении активности антиоксидантных ферментов. Антиоксидантные свойства пептида EDR проявляются в экспериментах на интактных животных и при действии экстремальных факторов внешней среды (гипоксия, гипокинезия). Под влиянием пептида EDR установлено снижение уровня АФК в гранулярных клетках мозжечка и снижение выраженности их апоптоза.

В тесте «открытое поле» выявлено защитное влияние пептида EDR на характеристики когнитивных функций у потомства самок крыс, подвергшихся во втором триместре беременности воздействию острой сублетальной гипобарической гипоксии.

Одним из факторов, обуславливающих антигипоксическое действие пептида EDR на потомство крыс в условиях пренатальной гипоксии, может быть защита от нейротоксического влияния гипергомоцистеинемии. В экспериментах с нейронами мозжечка животных, рожденных от крыс, получавших пептид EDR, установлены его нейропротекторные свойства, обуславливающие устойчивость клеток к окислительному стрессу, индуцируемому

перекисью водорода или лигандом глутаматных рецепторов N-метил-D-аспартатом.

Приведенные в данной главе результаты исследований об антиоксидантном действии пептида EDR, которое проявляется на различных уровнях организации живой материи, от клеток до организма в условиях действия экстремальных факторов внешней среды (гипоксия, гипокинезия), свидетельствуют о важной роли коротких пептидов в механизмах регуляции гомеостаза при старении.

Одним из механизмов действия пептида EDR может быть активация ERK 1/2 киназы – фермента, участвующего в передаче сигналов от глутаматных NMDA-рецепторов к ядру клетки. Активация этих рецепторов приводит к стимуляции ERK 1/2 киназы, развивающейся различными путями, в зависимости от того, какой лиганд активирует NMDA-рецепторы – NMDA или гомоцистеин (гомоцистеиновая кислота). В первом случае наступает кратковременная активация с последующим спадом активности, во втором случае – длительная активация, присущая эксайтотоксическому пути, приводящему к активации апоптоза. В этом заключается отличие механизма токсического эффекта гомоцистеина от природных лигандов. В этих условиях было показано, что карнозин и пептид EDR препятствуют активации ERK 1/2 киназы гомоцистеином и апоптозу, причем пептид EDR действует более эффективно и в меньших концентрациях. Установлено, что пептид EDR, в отличие от других регуляторов клеточного цикла (карнозин, N-ацетилцистеин), проявляет активность в меньших концентрациях (200 нМ), которым не свойственно прямое антиоксидантное действие.

Результаты проведенных исследований, демонстрирующие способность пептида EDR защищать нейроны от окислительного стресса, важны для преодоления патологии беременности, протекающей в условиях окислительного стресса. Можно прогнозировать, что использование пептида EDR при осложнениях беременности, индуцируемых или сопровождающихся внутриутробной гипоксией и гипергомоцистеинемией, благоприятно отразится на состоянии плода.

Литература

1. Арутюнян А.В., Дубинина Е.Е., Зыбина Н.Н. Методы оценки свободно-радикального окисления и антиоксидантной системы организма. СПб.: Фолиант, 2000. 104 с.
2. Арутюнян А.В., Козина Л.С., Арутюнов В.А. Токсическое влияние пренатальной гипергомоцистеинемии на потомство (экспериментальное исследование) // Журн. акуш. и женск. бол. 2010. Т. 59, № 4. С. 4–21.

3. Арутюнян А.В., Милютина Ю.П., Залозная И.В. и др. Использование различных экспериментальных моделей гипергомоцистеинемии в нейрохимических исследованиях // *Нейрохимия*. 2012. Т. 29, № 1. С. 83–88.
4. Беляева Г.С., Давыдова О.К., Ерофеев А.И. и др. Исследование актопротекторных свойств трипептида Пинеалона // *Биотехносфера*. 2015. № 3 (39). С. 25–31.
5. Болдырев А.А., Куклей М.П. Свободные радикалы в нормальном и ишемическом мозге // *Нейрохимия*. 1996. Т. 13, вып. 4. С. 271–278.
6. Карантыш Г.В., Менджеричкий А.М., Прокофьев В.Н. и др. Влияние Пинеалона на нейробиологические показатели крыс разного возраста // *Валеология*. 2014. № 4. С. 35–42.
7. Козина Л.С. Влияние биологически активных тетрапептидов на свободнорадикальные процессы // *Бюл. эксп. биол. и мед.* 2007. Т. 143, № 6. С. 690–692.
8. Козина Л.С., Арутюнян А.В., Стволинский С.Л., Хавинсон В.Х. Оценка биологической активности регуляторных пептидов в модельных экспериментах *in vitro* // *Успехи геронтологии*. 2008а. Т. 21, № 1. С. 68–73.
9. Козина Л.С., Кочкина Е.Г., Наливаева Н.Н. и др. Влияние пептидов вилон и эпиталон на уровень экспрессии неприлизина и инсулин-деградирующего фермента в клетках нейробластомы человека в норме и при гипоксии // *Нейрохимия*. 2008. Т. 25. С. 82–85.
10. Козина Л.С. Исследование антигипоксических свойств коротких пептидов // *Успехи геронтологии*. 2008. Т. 21, № 1. С. 61–67.
11. Козина Л.С., Арутюнян А.В., Стволинский С.Л. и др. Регуляторные пептиды защищают нейроны мозга от гипоксии в экспериментах *in vivo* // *ДАН*. 2008. Т. 418, № 3. С. 419–422.
12. Корневский А.В., Арутюнян А.В., Милютина Ю.П. и др. Пинеалон восстанавливает нарушенный в результате гипергомоцистеинемии суточный ритм содержания норадреналина в гипоталамусе самок крыс // *Нейрохимия*. 2014. Т. 31, № 3. С. 236–240.
13. Козина Л.С., Стволинский С.Л., Федорова Т.Н. и др. Изучение антиоксидантных и мембранопротекторных свойств коротких пептидов в модельных экспериментах // *Вопр. биологической, медицинской и фармацевтической химии*. 2008. Т. 6, № 6. С. 31–36.
14. Лысенко А.В., Арутюнян А.В., Козина Л.С. Пептидная регуляция адаптации организма к стрессорным воздействиям. СПб: Изд-во ВМА, 2005. 208 с.
15. Наливаева Н.Н., Макова Н.З., Кочкина Е.Г. и др. Влияние геропротекторных пептидов на активность холинэстераз и образование растворимой формы предшественника амилоидного пептида в клетках нейробластомы человека SH-SY5Y // *Нейрохимия*. 2011. Т. 28, № 3. С. 200–207.
16. Хавинсон В.Х., Кузник Б.И., Рыжак Г.А. Пептидные биорегуляторы – новый класс геропротекторов. Сообщение 1. Результаты экспериментальных исследований // *Успехи геронтологии*. 2012. Т. 25, № 4. С. 696–708.
17. Arutjunyan A., Kozina L., Khavinson V. et al. Pinealon protects the rat offspring from prenatal hyperhomocysteinemia // *Int. J. Clin. Exp. Med.* 2012. Vol. 5, N 2. P. 179–185.
18. Bagley Mark C., Davis Terence, Murziani Paola G.S. et al. Use of p38 MAPK inhibitors for the Treatment of Werner Syndrome // *Pharmaceuticals*. 2010. N 3(6). P. 1842–1872.
19. Bertho Á., Santiago M., Coutinho S. Flow cytometry in the study of cell death // *Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*. 2000. Vol. 95, N 3. P. 429–433.

20. *Boldyrev A.* Molecular mechanisms of homocysteine toxicity and possible protection against hyperhomocysteinemia. In: Recent. Adv. Nutrition and prevention of Alzheimer's disease. / Eds. Ch. Ramassamy, S. Bastianetto. Ct. 8. Trivandrum, 2009. P. 127–143.
21. *Herman J.P., Cullinan W.E.* Neurocircuitry of stress: central control of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis // *TiNS*. Vol. 20, N 2. P. 78–83.
22. *Gulyaeva N., Kudryashov I., Kudriashova I.* Caspase activity is essential for long-term potentiation // *J. Neurosci. Res.* 2003. Vol. 73. P. 853–864.
23. *Khavinson V., Kozina L., Arutjunyan A.* et al. Pinealon increases cell viability by suppression of free radical levels and activating proliferative processes // *Rejuvenation Research.* 2011. Vol. 14, N 5. P. 535–541.
24. *Kozina L.S., Arutjunyan A.V., Stvolinski S.L.* et al. Regulatory peptides protect brain neurons from hypoxia *in vivo* // *Doklady Biol. Sci.* 2008. Vol. 418. P. 7–10.
25. *Kozina L.S., Arutjunyan A.V., Stvolinski S.L., Khavinson V.Kh.* Biological activity of regulatory peptides in model experiments *in vitro* // *Adv. Gerontol.* 2008. Vol. 21. P. 68–73.
26. *Mendzheritskii A.M., Karantysh G.V., Ivonina K.O.* The effects of administering short peptides before occlusion of the carotid arteries on the behavior and caspase-3 activity in the brain of old rats // *Adv. Gerontology.* 2011. Vol. 1, N 4. P. 322–327.
27. *Mendzheritskii A.M., Matsionis A., Lysenko A.* The role of DSIP in calpain activity regulation under hypoxia // In “*Neurochemistry*”: Cellular, Molecular and Clinical Aspects / Eds. Telken and Korf. Plenum Press, 1997. P. 419–422.
28. *Skulachev V.P.* Cationic antioxidants as a powerful tool against mitochondrial oxidative stress // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2013. Vol. 441, N 2. P. 275–279.
29. *Zinovkin R.A., Egorov M.V., Manskikh V.N.* et al. Mitochondrial targeting of antioxidants // In “*Systems Biology of Free Radicals and Antioxidants Berlin*”. 2014. P. 323–354.

Глава 5

Нейропротекторные свойства пептида EDR в экспериментах на насекомых

5.1. Влияние пептида EDR на условно-рефлекторную деятельность медоносной пчелы *Aris mellifera L.*

Биохимическая и физиологическая общность механизмов формирования памятного следа в нервной системе у позвоночных и беспозвоночных животных позволяет использовать насекомых в качестве модельного объекта изучения влияния пептидов на условно-рефлекторную деятельность. Частым модельным объектом является медоносная пчела (*Aris mellifera L.*). Многолетние исследования свидетельствуют о способности этого вида насекомых к осуществлению высших форм нервной деятельности: ассоциативному обучению, долговременному хранению в памяти приобретаемого в процессе пищедобывательной деятельности индивидуального опыта, а также об использовании при этом рецепторных, сигнальных, трансдукционных механизмов, сходных с млекопитающими и обеспечивающих функционирование высших отделов ЦНС насекомых, ответственных за когнитивную деятельность. У пчелы высшие отделы ЦНС, выполняющие основную роль в обонятельном обучении и памяти при пищевом подкреплении, — представляют собой парные грибовидные тела, находящиеся в головном отделе.

Объектом исследования влияния пептида EDR на условно-рефлекторную когнитивную деятельность индивидуума является медоносная пчела краинской расы *Aris mellifera carnica Pollm* в возрасте 10–40 дней. В качестве используемой парадигмы выступает широко применяющаяся при исследовании условно-рефлекторной деятельности пчел — образование пищевого условного рефлекса вытягивания хоботка на обонятельный раздражитель (PER — Proboscis Extension Response conditioning).

Отбор пчел для исследования проводили следующим образом. До обучения у пчел проверяли сенсорную возбудимость, т.е. наличие спонтанной реакции вытягивания хоботка на еще неподкрепленный запах и пищевую возбудимость — вытягивание хоботка в ответ на соприкосновение раствора сахарозы с антеннами. При наличии сенсорной и в отсутствии пищевой возбудимости пчел не использовали в эксперименте. За 3 часа до процедуры обучения пчел изолировали, т.е. лишали пищи и контакта с семьей для повышения пищевой мотивации.

Суть эксперимента состояла в том, чтобы проверить выработку условного рефлекса, состоящего в вытягивании хоботка при однократном сочетании запаха гвоздики и пищевого подкрепления (50% раствора сахарозы) у фиксированных за крылья пчел через 1 минуту (кратковременная память) и 180 минут (долговременная память) по окончании процедуры обучения. За 30 минут до обучения пчелам экспериментальной группы дорзально в торакс инъектировали 2 мкл раствора пептида EDR в ряду концентраций 10^{-11} – 10^{-4} М, а пчелам контрольной группы 2 мкл физиологического раствора. Число особей в каждой серии экспериментов было 36/60. Число пчел, ответивших условной реакцией, оценивали в % по отношению к числу пчел контрольной группы, принятому за 100%.

В результате экспериментов было установлено, что эффективные концентрации пептида EDR находились в диапазоне 10^{-10} – 10^{-5} М. При этом выявлено, что если пептид EDR оказывал стимулирующее или ингибирующее влияние на кратковременную память при использовании всех указанных концентраций, то воздействие на долговременную память оказывали только низкие концентрации пептида EDR в диапазоне 10^{-10} – 10^{-8} М.

Обнаружено, что стимулирующий или ингибирующий эффект пептида EDR зависит от фонового условно-рефлекторного уровня. В среднем $67,8 \pm 1,3\%$ пчел сохраняют в кратковременной/долговременной памяти выработанный условный рефлекс на обонятельный раздражитель при пищевом подкреплении. Поэтому все насекомые были разделены на 2 подгруппы — в первой условно-рефлекторный фон отклонялся от среднего значения в меньшую сторону, когда $47,6 \pm 3,5\%$ пчел сохраняли в памяти условную реакцию. Во второй подгруппе контрольный условно-рефлекторный фон отклонялся от среднего значения в большую сторону — $92,3 \pm 4,7\%$ пчел сохраняли в памяти условную реакцию. Введение пептида EDR в случае исходного низкого условно-рефлекторного уровня оказывало стимулирующее воздействие на процессы,

способствующие сохранению в памяти выработанного условного рефлекса (рис. 5.1). При концентрации пептида EDR 10^{-8} М количество пчел, сохраняющих в кратковременной памяти условную реакцию, увеличивалось на 23% по сравнению с начальным низким условно-рефлекторным уровнем. При концентрации пептида EDR 10^{-7} М количество таких пчел увеличивалось на 40%, при концентрации 10^{-6} М – на 28%, при концентрации 10^{-5} М – на 36%. На сохранение в долговременной памяти выработанного рефлекса у пчел с исходно низким условно-рефлекторным уровнем пептид EDR не оказывал влияния.

Иная картина наблюдалась при исходном высоком фоновом условно-рефлекторном уровне (рис. 5.2). В этом случае при воздействии пептида EDR в диапазоне 10^{-10} – 10^{-7} М количество пчел, сохраняющих в кратковременной и долговременной памяти условную реакцию, значительно снижалось. При введении пептида EDR в концентрации 10^{-10} М количество пчел, сохраняющих в кратковременной памяти условную реакцию, уменьшалось на 34%, а количество пчел, сохраняющих в долговременной памяти условную реакцию, снижалось на 15% по сравнению с исходным высоким условно-рефлекторным уровнем. Концентрация пептида EDR 10^{-9} М оказывала ингибирующее влияние только на кратковременную память. При этом количество пчел, сохраняю-

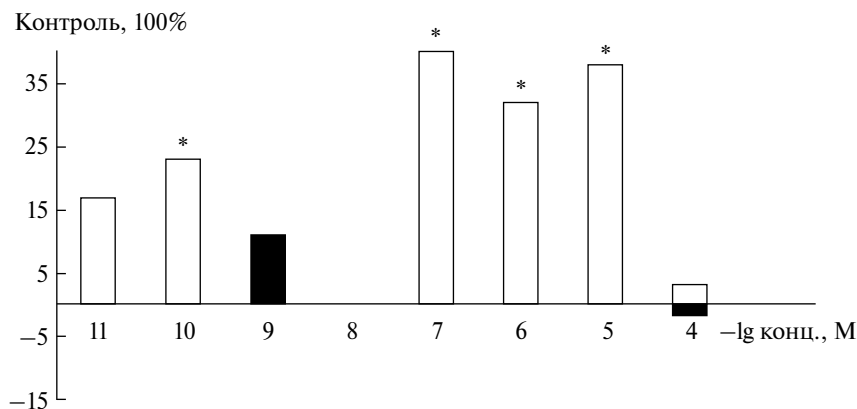


Рис. 5.1. Влияние пептида EDR на формирование кратковременной/долговременной памяти у медоносных пчел с исходно низкой способностью сохранять в памяти выработанный условный рефлекс. Условные обозначения: белые столбики – кратковременная память (КП), черные столбики – долговременная память (ДП) по отношению к контрольному уровню (инъекции физиологического раствора), принятому за 100%; * – $p < 0,05$ по сравнению с соответствующим контролем

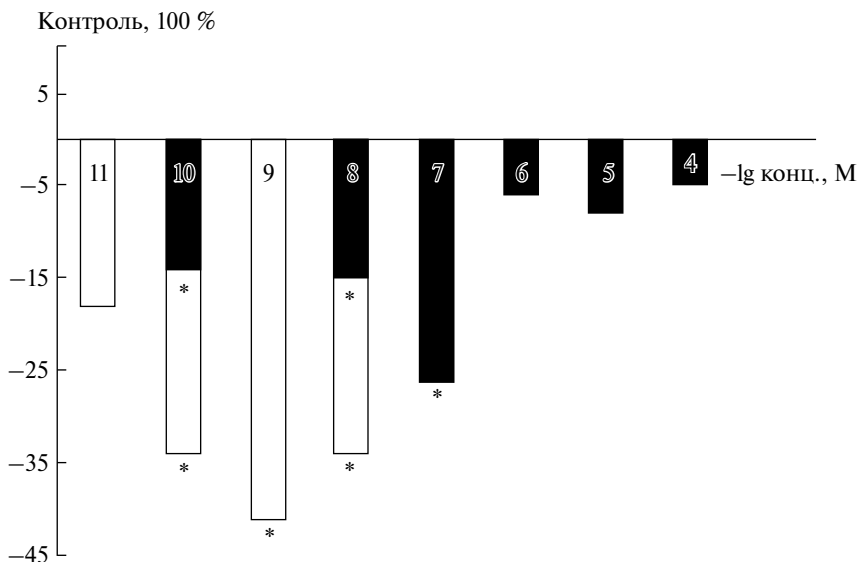


Рис. 5.2. Влияние пептида EDR на формирование кратковременной/долговременной памяти у медоносных пчел с исходно высокой способностью сохранять в памяти выработанный условный рефлекс. Обозначения как на рис. 5.1

щих в кратковременной памяти условную реакцию, уменьшалось на 38%. Концентрация пептида EDR 10^{-8} М оказывала влияние на оба вида памяти. Количество пчел, способных сохранять приобретенный опыт в кратковременной памяти, уменьшалось на 35%, а в долговременной памяти – на 17%. Воздействие пептида EDR в концентрации 10^{-7} М ингибировало долговременную память – количество пчел, сохраняющих в памяти условную реакцию, уменьшалось на 30%.

Таким образом, одна и та же концентрация пептида EDR стимулировала процесс формирования способности к сохранению памяти у пчел с исходно низкой пищевой мотивацией, но ингибировала этот процесс у пчел с исходно высокой пищевой мотивацией. То есть пептид EDR обладает выраженной модулирующей способностью в зависимости от высокого или низкого условно-рефлекторного фона. Эта высокая модулирующая способность пептида EDR, в зависимости от уровня исходного условно-рефлекторного фона, отражает одну из его существенных характеристик, как пептида, способного поддерживать функциональный баланс в данной ткани.

Проведенные исследования позволили сделать вывод о влиянии пептида EDR на функцию высших отделов ЦНС, ответственных за когнитивную деятельность, у насекомых. Эти данные оказались схожими с результатами других работ, в которых исследовалось влияние пептида EDR на нервную ткань головного мозга млекопитающих.

Проведенные эксперименты подтвердили сходство в биорегуляторном действии пептида EDR как на уровне функционирования нервных клеток в культуре, так и на уровне организма пчел, а именно, образования условного рефлекса, его сохранения и воспроизведения. Необходимо отметить, что в последние десятилетия появился большой ряд работ о чувствительности человека и животных к ультрамалым концентрациям биологически активных веществ. В литературе можно встретить термины для обозначения сверхмалых доз и их эффектов: ультрамалая концентрация, сверхмалые дозы. Эффективность сверхмалых доз биологически активных веществ продемонстрирована в опытах на всевозможных биологических моделях (изолированные ферменты, клетки, ткани, лабораторные животные) и в клинических исследованиях. Эти эффекты проявляются при концентрациях в диапазоне 10^{-18} – 10^{-12} М, т.е. они на 4–6 порядков ниже минимальных наблюдаемых констант диссоциации лиганд-рецепторных комплексов, лежащих в диапазоне 10^{-11} – 10^{-10} М, и часто наблюдаются даже несмотря на наличие в тестируемой биологической системе эндогенных веществ в превышающих концентрациях. Чаще всего эффект появляется при концентрациях от 10^{-12} до 10^{-17} моль/л, благодаря чему и появились термины «пикомолярная» и «фетомолярная» чувствительность.

Спектр эффекта ультрамалых доз обычно меньше, чем у биологически активных веществ в обычной дозе. Например, феназепам в обычных дозах обладает транквилизирующим и снотворным действием, поэтому применяется в качестве ночного транквилизатора. Сверхмалые дозы феназепама сохраняют транквилизирующую активность, но полностью теряют снотворный эффект, что позволяет использовать этот препарат в качестве дневного транквилизатора. При введении собакам антидиуретического гормона в субпикомолярных концентрациях (10^{-13} моль/л) наблюдается уменьшение диуреза, хотя эндогенная концентрация этого гормона значительно больше. Аналогичная ситуация складывается и с экзогенными агентами. На модели лазер-индуцированного тромбоза мезентериальных сосудов установлено, что известный антикоагулянт аспирин в ультрамалых концентрациях (10^{-30} мг/кг) обладает мощным протромботическим эффектом. Например, комбинированное

введение двух доз аспирина — классической (100 мг/кг) и сверхмалой (10^{-30} мг/кг) — приводит к укорочению времени кровотечения, т. е. перевешивает эффект сверхмалой дозы.

Важной практической особенностью «сверхмалых доз» является исчезновение ряда побочных эффектов классических доз препарата. Выявленная закономерность заинтересовала в первую очередь онкологов, работающих с высокотоксичными препаратами. Выяснилось, что эффективность сверхмалых доз доксорубина сравнима с эффективностью стандартной дозы, а токсичность значительно меньше.

Все эти данные свидетельствуют о том, что для развития эффекта важно не абсолютное количество действующего биологически активного вещества, а необходим сдвиг концентрации, способствующий развитию эффекта действия этого вещества. При усложнении степени организации ткани требуются все меньшие концентрации биологически активных веществ. Поскольку активирующее память действие пептида EDR у пчел выявлено в диапазоне 10^{-10} – 10^{-7} М, а в коре головного мозга крыс — в диапазоне меньших концентраций 10^{-12} – 10^{-11} М, можно также говорить о том, что по мере усложнения строения и функций нервной ткани она становится все более чувствительна к малым концентрациям эффективно действующего пептида EDR.

Таким образом, выявлено, что биорегуляторный пептид EDR эффективен в наномолярных дозах при действии на нервную ткань млекопитающих и насекомых. Создается база для разработки на его основе лекарственных ноотропных препаратов, причем с уменьшенной выраженностью побочных эффектов за счет эффективного действия ультрамалых концентраций. Пептид EDR следует отнести к одному из перспективных препаратов, который может быть использован для корректировки патологических состояний нервной системы. Проведенные исследования влияния пептида EDR на кратковременную и долговременную память у пчел подчеркивают модулирующие свойства этого пептида.

Кроме того, полученные данные свидетельствуют о том, что существует единый механизм пептидергической регуляции экспрессии генов и синтеза белков в живой природе. Параллелизм действия пептида EDR на когнитивную деятельность у грызунов и насекомых позволяет предположить существование общего, возможно, древнейшего в эволюции, механизма пептидной регуляции функционирования нервной системы у всех организмов животного мира.

5.2. Нейропротекторное действие пептида EDR в модели болезни Паркинсона у *Drosophila melanogaster*

Для ускорения процесса скрининга и тестирования средств терапии нейродегенеративных заболеваний необходимо обращение к простым модельным организмам с кратким жизненным циклом, дешевым в содержании и свободным от законодательных ограничений по защите животных. К их числу относится дрозофила (*Drosophila melanogaster*), поскольку после завершения программы «геном человека» было выяснено, что 75% генов человека и дрозофилы обладают высокой степенью гомологии. Кроме того, продолжительность жизни дрозофилы составляет 40–50 дней, а цикл воспроизведения – 10 дней. При этом скрининг нейропротекторных свойств потенциальных биологически активных веществ возможен уже на 5 сутки (стадия имаго – взрослые мухи) и 6 сутки (III стадия личинки) жизненного цикла дрозофилы.

Для создания животной модели нейробиологических заболеваний требуется показать наличие триады диагностических признаков: 1) дефекты памяти и обучения, проявляющиеся как прогрессирующая потеря памяти; 2) локомоторные дефекты, наиболее ярко выраженные при БП и БХ; 3) амилоидоподобные включения в нейронах, локализованные в цитоплазме при БА и БП и в ядре при БХ. Модель *Drosophila melanogaster* удобна еще и тем, что уже на 5 сутки возможно провести анализ локомоторных нарушений, которые являются одними из признаков нейродегенеративных заболеваний.

В качестве модели болезни Паркинсона в исследовании использовали дрозофилы с деменцией и тельцами Леви – мутант Agnst3 локуса agnostic, несущего дефектный ген для LIM-киназы (LIMK-1) – ключевого фермента ремоделирования актина. Этот локус был обнаружен в линии дикого типа Canton-S в процессе скрининга индуцированных этилметансульфонатом температурочувствительных мутаций в X-хромосоме, которые затрагивают метаболизм цАМФ. У мутанта Agnst3 наблюдается температурочувствительная летальность в развитии при 29 °С. Однако действие температуры 37 °С в течение 30 минут (тепловой шок) не приводит к гибели Agnst3, но при этом резко меняет фенотипические проявления мутации. При нормальной температуре мутант воспроизводит три основных диагностических признака нейродегенеративных заболеваний, описанных выше. Мутация Agnst3 приводит к резкому снижению локомоторной активности, тремору мышц, присутствию амилоидо-подобных агрегатов и нарушениям памяти. Эти проявления в значительной степени устраняются действием

теплого шока, что позволяет использовать это воздействие в качестве сравнительного фактора при оценке нейропротекторной активности потенциальных лекарственных средств.

Известно, что в ответ на тепловой шок происходит активация системы белков группы HSP и изменение конформаций компонентов актинового каскада. Установлено, что белки LIMK-1 и HSP70 (аналог HSPA1A у человека) при воздействии теплового шока взаимодействуют. При стрессорных воздействиях наблюдается перемещение комплекса LIMK-1 – кофилин в ядро, что может служить одной из основ для ремоделирования актина ядра и избирательного запуска транскрипции. Также установлено, что экранирование живых объектов от естественного геомагнитного поля (нахождение в ослабленном геомагнитном поле – ОГМП) оказывает негативное воздействие на центральную нервную систему. Механизм его действия подобен слабому оксидативному стрессу и связан с митохондриальными нарушениями. В реализации стрессорного ответа на это воздействие принимают участие белки LIMK-1, Adh (алкогольдегидрогеназа), Fbp2 (Fat body protein). Таким образом, были использованы две модели стрессорного воздействия: теплового шока и экранирования магнитного поля Земли. Эти две модели стресса были выбраны нами в связи с тем, что для пептида EDR было отмечено выраженное антистрессорное и антиоксидантное действие.

Под тепловым шоком понимали 30-минутное воздействие при температуре 37 °С, а затем 1 час при комнатной температуре. Для экранирования магнитного поля Земли использовали цилиндрическую камеру, покрытую экранирующим материалом, созданным на основе аморфного магнитомягкого сплава АМАГ 172. Коэффициент экранирования по постоянному магнитному полю был равен 30. Дрозофилы находились в экранирующей камере в течение 1 часа. После воздействия мух оставляли в течение часа при температуре 25 °С и нормальном уровне магнитного поля, а затем использовали в эксперименте.

Личинок и имаго дрозофилы выращивали на стандартной изюмно-дрожжевой среде и световом цикле 12:12. Все личинки и имаго были разделены на 2 группы: 1 – контроль (развитие на среде без добавления пептида EDR), 2 – экспериментальная (развитие на среде с пептидом EDR). В качестве дополнительного контроля использовали линию дикого типа Canton-S, не имеющую каких-либо фенотипических особенностей. Пептид EDR применяли по следующей схеме: 5 мкг пептида добавляли к 100 мл питательной среды для развития дрозофилы. Таким образом, концентрация пептида EDR в питательной среде составила 0,05 мкг/мл. Развитие дрозофилы, от стадии яйца до стадии окукливания, на которой особь пере-

стает питаться и проходит метаморфоз в течение 4 суток в оболочке куколки, происходило на питательной среде с пептидом (рис. 5.3, А и Б приведены на вклейке). Особи контрольной группы развивались на питательной среде без добавления пептида EDR. После вылета мух отбирали и сортировали по полу без применения наркотизации и содержали в индивидуальных камерах на среде без добавления пептида EDR до достижения 5-дневного возраста.

Как уже было отмечено, для создания животной модели болезни Паркинсона требуется показать дефекты памяти и обучения, а также локомоторные дефекты. Поэтому нейропротекторный эффект пептида EDR исследовали в поведенческих экспериментах на локомоцию, а также обучение и память.

Исследование локомоторного поведения

Для регистрации локомоторного поведения личинок и имаго дрозофил использовали автоматизированную установку, позволяющую одновременно регистрировать показатели у 20 мух или 16 личинок. Тестирование локомоторного поведения личинок проводили на личинках 3-го возраста (стадия активного движения личинки перед окукливанием). Для получения синхронной популяции из стаканов с личинками в течение 2-х часов отбирали личинок, выползающих из среды на стенке стакана. Тестирования локомоторного поведения имаго проводили на 5-суточных самцах, считая от момента вылета из куколки.

Движение мух происходило в специальной экспериментальной камере, изображенной на рис. 5.4. Камера представляет собой три слоя органического стекла, скрепленные винтами. Верхние два слоя прозрачные, нижний матовый. В среднем слое прорезаны отверстия, в которые помещаются экспериментальные животные. Отверстия закрываются специальными заглушками. Толщина стекла (и соответственно высота камеры) составляет 3 мм, поэтому муха может двигаться только в плоскости камеры.

Для регистрация локомоторного поведения личинки использовали камеру схожей конструкции. Основу камер составляет стеклянная пластина, к которой крепится подложка из влажной хлопчатобумажной ткани темного цвета. Сверху накладывается пластиковая пластина с вырезанными отверстиями, образующая 8 отдельных камер для каждой личинки. Диаметр камер составляет 20 мм, а высота – 1,6 мм, таким образом, личинка может двигаться только в плоскости камеры. После помещения личинок камеры закрывают сверху предметными стеклами и закрепляют.

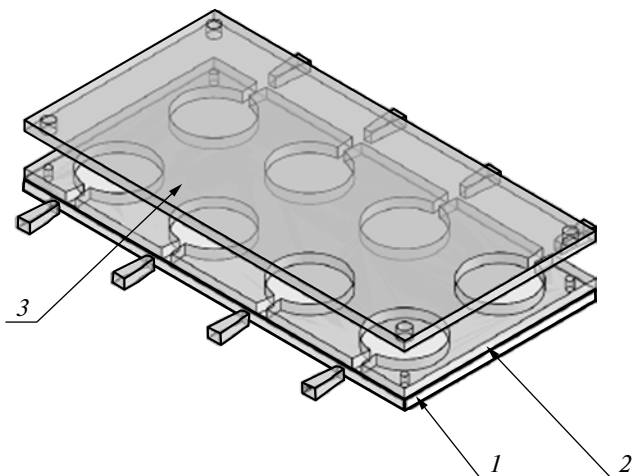


Рис. 5.4. Схема экспериментальной камеры для регистрации локомоторного поведения имаго дрозофилы: 1 – стеклянная пластина; 2 – подложка; 3 – пластина с отверстиями

Камера размещается над светодиодной панелью, что обеспечивает равномерное освещение и контрастное изображение. Использование светодиодов исключает нагревание камеры в процессе проведения эксперимента. Над камерой располагается цифровая камера высокого разрешения AVR-803. Локомоторное поведение можно анализировать с помощью двух показателей: активности движения и способности к зрительно-пространственной ориентации. Для исследования активности движения осуществляли запись видеосигнала с камеры. Длительность всех записей составляла 1 час. В процессе эксперимента вокруг камеры поддерживали температуру 23 °С.

Полученную видеозапись анализировали при помощи открытого программного обеспечения LocoTrack, которое позволяет загрузить видеозапись локомоторного поведения, отметить на экране области, соответствующие ячейкам, выбрать значения контраста и визуально оценить надежность распознавания. После этого запускается процесс анализа видеозаписи и построения траектории движения для каждой ячейки. Траектория записывается по перемещению центра масс объекта. Для проведения анализа несколько видеозаписей объединяются в проект. Вначале записи проверяются на отсутствие ошибок – потерь объекта и резких перемещений со скоростью, превышающей максимально возможную скорость движения мухи (такие броски свидетельствуют о том, что экспериментальное животное было потеряно и анализатор траектории переключился на посторонний объект). После проверки на ошибки

записанная траектория разделяется на периоды покоя и движения. Деление происходит по порогу скорости перемещения, подобранному по результатам визуального наблюдения и равному 5 мм/с для взрослых мух и 0,2 мм/с для личинок. Анализируются индекс активности (доля времени, проведенного в движении), частота побегов, длительность, длина и скорость каждой побежки.

Для анализа обработанных данных использовали язык статистической обработки данных R. Поскольку, как было показано по анализу гистограмм, распределение параметров локомоторной активности существенно отличается от нормального, для анализа параметров локомоции применяли методы непараметрической статистики – дисперсионный анализ по Краскелу–Уолису с последующим множественным сравнением средних рангов всех исследуемых групп.

Для изучения способности к зрительно-пространственному ориентированию проводили визуальный анализ по форме траекторий движения (треков) личинок. Данный способ анализа локомоторного поведения позволяет охарактеризовать, как животное способно ориентироваться в окружающей среде при реализации исследовательской активности. Все проанализированные треки были разделены на 3 класса. Характерный вид и описание треков каждого класса представлено на рис. 5.5.

После проведения пилотных экспериментов и после сопоставления визуального движения насекомого с рассчитанными показателями в качестве количественного критерия пространственного ориентирования была выбрана доля треков первого типа по отношению к общему числу записанных треков.

Для определения достоверности различий в распределении треков личинок использовали двусторонний t-критерий для долей.

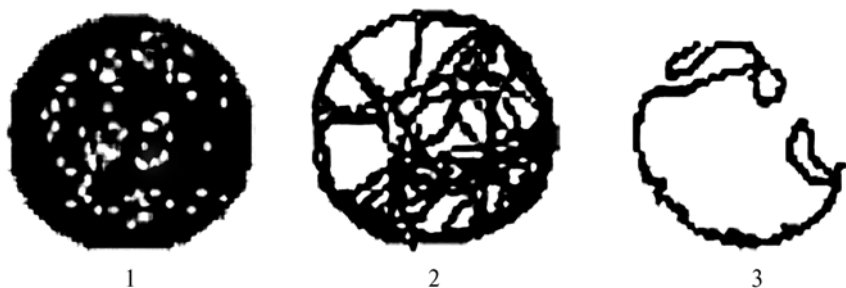


Рис. 5.5. Образцы классов треков: 1 – полностью заполняющие экспериментальную камеру, т.е. все доступное для передвижения пространство; 2 – с дефектами пространственного ориентирования, т.е. животное исследует не все доступное для движения пространство; 3 – со значительными дефектами пространственного ориентирования, т.е. интенсивность движения очень маленькая, исследуемое пространство крайне ограничено

Достоверность всех различий рассчитана на уровне значимости $p < 0,05$.

В качестве модели для тестирования памяти использовали метод условно-рефлекторного подавления ухаживания (УРПУ). При ухаживании самца за оплодотворенной самкой сочетаются два безусловных стимула – аттрактивный (стимулирующий ухаживание феромон – афродизиак) и аверсивный (подавляющий ухаживание феромон – антиафродизиак). Антиафродизиаком обладают только оплодотворенные самки, и высвобождают его в ответ на ухаживание самца. В результате сочетания аттрактивный стимул становится аверсивным условным стимулом, что снижает его аттрактивные свойства. Степень аттрактивности или аверсивности стимула определяется по таким реакциям животного, как приближение к стимулу или удаление от него.

Для поведенческих опытов вылупившихся насекомых без наркотизации сортировали по полу. Отбирали самцов исследуемых линий и содержали их индивидуально на изюмно-дрожжевой среде. В качестве объектов ухаживания для самцов всех анализируемых линий использовали оплодотворенных за сутки до опыта самок линии Canton-S (CS) в возрасте 5 суток. Исследования проводили на взрослых мухах в возрасте 5 дней при температуре $+25 \pm 0,5$ °C в первой половине дня.

Для выработки УРПУ (тренировки) 5-суточного самца тестируемой линии, не имеющего опыта полового поведения, помещали в экспериментальную камеру вместе с оплодотворенной 5-суточной самкой CS. Память тестировали через разные интервалы времени. В качестве контроля использовали самцов, не имеющих опыта полового поведения. Этограмму поведения самца регистрировали в течение 300 с, фиксируя время начала отдельных элементов ухаживания (ориентация и преследование, вибрация, лизание, попытка копуляции), а также время исполнения элементов, не связанных с ухаживанием (активность, побежка, прининг, покой). Регистрацию начинали через 45 с после помещения мухи в камеру. В каждой группе (контрольной, сразу после тренировки и через определенные интервалы времени после тренировки) тестировали не менее 20 пар мух.

Для каждого самца вычисляли индекс ухаживания (ИУ), т.е. время ухаживания самца за самкой, выраженное в процентах от общего времени наблюдения. Для количественной оценки результатов обучения вычисляли индекс обучения (ИО) по следующей формуле:

$$\frac{\text{ИУН} - \text{ИУТ}}{\text{ИУН}} \times 100\% = \left(1 - \frac{\text{ИУТ}}{\text{ИУН}}\right) \times 100\%,$$

где ИУН и ИУТ – средние индексы ухаживания для независимых выборок самцов, не имеющих опыта полового поведения, и самцов, прошедших тренировку, соответственно.

Кроме комплексной оценки способности к обучению и формированию памяти, был проведен поэлементный анализ поведения ухаживания у исследуемых линий дрозофилы, в частности, были проанализированы такие важные элементы поведения, как активность, ориентация и вибрация.

Методика условно-рефлекторного подавления ухаживания была использована для оценки способности к обучению и формированию краткосрочной и долгосрочной памяти самцов дрозофилы.

Для оценки способности к обучению и формированию краткосрочной памяти 5-суточного самца тестируемой линии, не имеющего опыта полового поведения, помещали в экспериментальную камеру вместе с оплодотворенной 5-суточной самкой CS и оставляли на 30 минут. Обучение и память тестировали сразу (0 мин) и через 3 часа (180 мин) после тренировки, используя новых оплодотворенных самок CS в возрасте 5 суток.

Долгосрочную память у самцов вырабатывали условно-рефлекторным подавлением ухаживания за оплодотворенными самками в соответствии с протоколом УРПУ по Siegel и Hall (1979 г.) с модификациями. Пятисуточного самца тестируемой линии, не имеющего опыта полового поведения, помещали вместе с оплодотворенной 5-суточной самкой CS в стакан с питательной средой (объем свободного пространства – около 3 см³) и оставляли на 5 часов. Обучение и память тестировали через разные интервалы времени: сразу после тренировки, через 2 суток и через 8 суток после тренировки, используя новых оплодотворенных самок CS в возрасте 5 суток.

Для регистрации параметров ухаживания самца и девственную самку помещали в камеру из оргстекла диаметром 15 и высотой 5 мм. Продолжительность наблюдения за ухаживанием самца составляла 10 минут.

Фиксировали латентный период до ухаживания и время начала копуляции. Длительность ухаживания рассчитывали как разность времени копуляции и начала ухаживания. Эффективность ухаживания вычисляли как процент пар, копулировавших в течение периода наблюдения. В каждой линии тестировали не менее 20 пар мух.

Для оценки уровня экспрессии генов нервной системы использовали метод RealTime PCR. Выделение тотальной РНК производили из 70 голов имаго дрозофилы методом хлороформной экстракции. Концентрацию нуклеиновых кислот в пробе измеряли

спектрофотометрированием при длине волны 260 нм. Полученную тотальную РНК обрабатывали ДНКазой 1. Для проведения реакции обратной транскрипции использовали РНК-зависимую ДНК-полимеразу M-MuLV Reverse transcriptase.

Полученную таким образом кДНК использовали в реакции RealTime PCR. Для проведения реакции использовали рекомбинантную ДНК-полимеразу «Как-то Taq». Для детекции сигнала использовали флуоресцентный краситель SybrGreen, способный специфически связываться с двунитевой ДНК.

Реакцию проводили в RealTime PCR. В реакции использовали следующие праймеры, полученные из базы праймеров FlyPrimerBank:

Ген	Направление	Праймер
Rpl32	forward	5'-GCCGCTTCAAGGGACAGTAT-3'
	reverse	5'-GCGCTTGTTCGATCCGTAAC-3'
aTub84B	forward	5'-GATCGTGTCTCGATTACCGC-3'
	reverse	5'-GGGAAGTGAATACGTGGGTAGG-3'
limk1	forward	5'-GTGAACGGCACACCAGTTAGT-3'
	reverse	5'-ACTTGCACCGGATCATGCTC-3'
rok	forward	5'-ACCGATGGCAGCAAGATATC-3'
	reverse	5'-GACATTAACCGCATACGGCT-3'
Parkin (park)	forward	5'-ATTTGCCGGTAAGGAACCTAAGC-3'
	reverse	5'-AAGTGGCCGACTGGATTTTCT-3'

Праймеры и флуоресцентные пробы были подобраны таким образом, чтобы взаимодействовать со всеми изоформами РНК исследуемых генов. Содержание кДНК в пробах нормировали относительно содержания кДНК рибосомного белка гр49, уровни экспрессии генов у мутантов нормировали по отношению к таковым у CS. Величины, выделяющиеся из совокупности экспериментальных данных, отбрасывали с помощью статистического метода Граббса. Оценка достоверности различий осуществлялась с использованием статистического теста рандомизации. Исходное содержание в пробе кДНК обратно зависит от цикла Ct, при котором амплификация достигает логарифмической стадии: $[RNA] = X/(2^{Ct})$. В качестве внутреннего контроля содержания РНК в пробе использовали РНК-продукт гена рибосомального белка гр49 (пара праймеров Rpl32), уровень экспрессии которого полагали неизменным в раз-

ных линиях на разных сроках жизни имаго. Относительно него нормировали содержание всех других РНК-продуктов (x) в пробе: $[RNAX] = [RNA(x)/RNA(gp49)] = 1/2^{dCt}$, где $dCt = Ct(x) - Ct(gp49)$. Уровень экспрессии гена x для линии y (v , sp , cd) и возраста z нормировали по отношению к таковой для CS (x , y , z): $[x] = [RNA_x(y)/RNA_x(CS)]$.

Исследование влияния пептида EDR на локомоторную активность мух

Без воздействия пептида EDR активность личинок мутанта *Agnts3* в 4 раза хуже, чем у личинок Canton-S, при этом индекс способности к пространственному ориентированию снижен в 3 раза (рис. 5.6, см. на вклейке). У взрослых мух активность не страдает, а пространственное ориентирование снижено в 12 раз (рис. 5.7, см. на вклейке).

В нормальных условиях под действием пептида EDR в 2 раза возрастала общая локомоторная активность личинок мух, однако этот показатель у имаго не изменялся. При этом пептид EDR повышал способность личинок и имаго ориентироваться в пространстве соответственно в 1,9 и 3,5 раза (рис. 5.8). При изучении стрессорных воздействий в контрольной группе было установлено, что тепловой шок почти в 2 раза повышает у личинок общую локомоторную активность, что согласуется с полученными ранее данными, а экранирование ОГМП не влияет на этот показатель (рис. 5.8–5.10). При этом тепловой шок повышает способность к пространственному ориентированию у личинок и имаго соответственно в 1,3 и 1,4 раза (рис. 5.9). Экранирование ОГМП способствует повышению способности к пространственному ориентированию у имаго в 1,5 раза (рис. 5.8 и 5.10).

При воздействии теплового шока после применения пептида EDR общая локомоторная активность личинок возрастала в 1,3 раза. Однако общая локомоторная активность имаго при влиянии теплового шока после применения пептида EDR снижалась в 5 раз. Пептид EDR не влиял на пространственное ориентирование личинок мух и имаго после воздействия теплового шока (рис. 5.9).

При экранировании магнитного поля Земли пептид EDR повышал общую локомоторную активность личинок дрозофилы в 2,2 раза и не влиял на этот показатель у взрослых мух. Обратный результат был получен для показателя пространственного ориентирования. Пептид EDR повышал этот показатель в 1,4 раза у имаго, но не влиял на него у личинок (рис. 5.10).

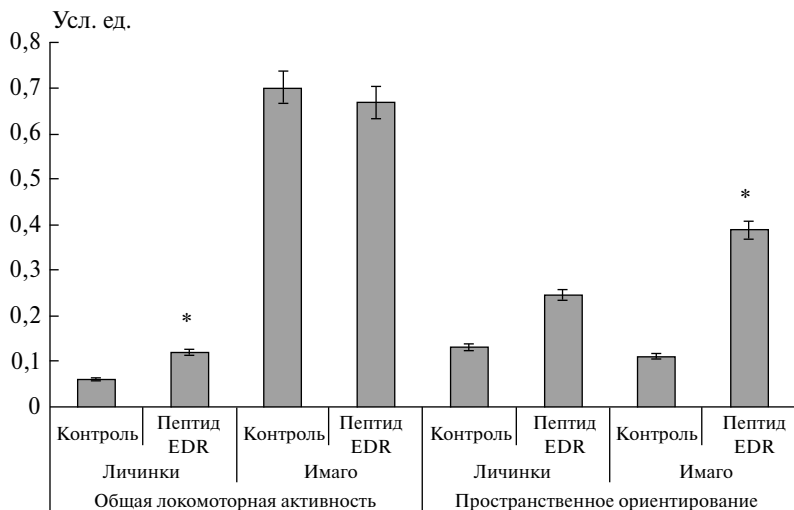


Рис. 5.8. Влияние пептида EDR на локомоторную активность дрозофилы в нормальных условиях; * – $p < 0,05$ по сравнению с соответствующим контролем

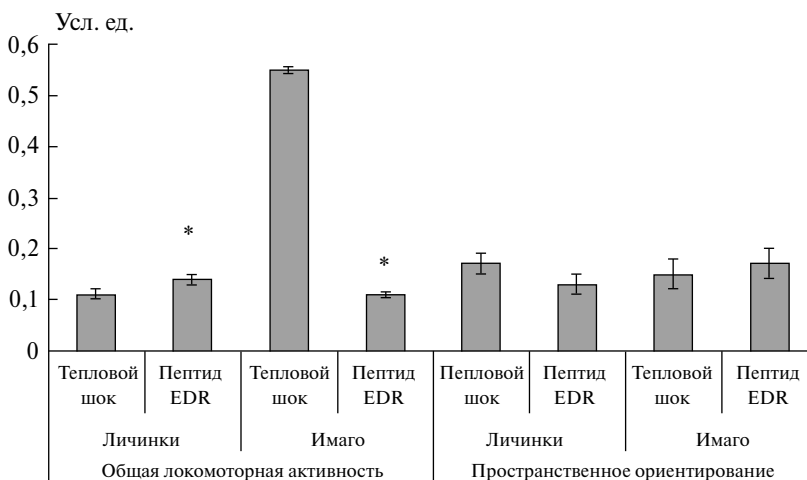


Рис. 5.9. Влияние пептида EDR на локомоторную активность дрозофилы после действия теплового шока; * – $p < 0,05$ по сравнению с соответствующим контролем

Таким образом, пептид EDR повышает локомоторную активность у дрозофилы *Agnst3* с выраженными симптомами болезни Паркинсона в нормальных условиях и при стрессорном воздействии – экранировании ОГМП, однако не обладает таким эффектом при тепловом шоке. Поскольку у мутанта *Agnst3* тепловой шок приводит к практически полному восстановлению локомо-

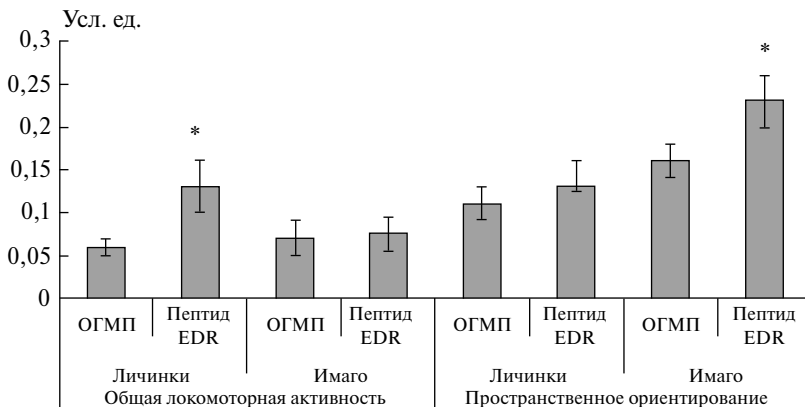


Рис. 5.10. Влияние пептида EDR на локомоторную активность после экранирования магнитного поля Земли; * – $p < 0,05$ по сравнению с соответствующим контролем

торной активности, вероятно, пептид EDR не оказывает стимулирующего влияния.

Наблюдаемое при этом восстановление локомоторной активности у этой мутантной линии мух при нормальных условиях и экранировании ОГМП свидетельствует о восстановлении функций центральной нервной системы и выраженном нейропротекторном действии пептида EDR. Поскольку ранее было установлено, что пептид EDR снижает оксидативный стресс в культурах нейронов гиппокампа, представляется вероятным, что в основе нивелирования проявлений болезни Паркинсона в модели у мух лежит его способность активировать антиоксидантную систему клеток. Поскольку ранее было выдвинуто предположение, что пептид EDR реализует свои нейропротекторные эффекты через эпигенетическую регуляцию экспрессии генов, возможно, одними из генов-мишеней являются те, которые вовлечены в развитие болезни Паркинсона, что требует дальнейших исследований.

Влияние пептида EDR на способность к обучению и памяти

В нормальных условиях мутант *Agnts3* демонстрирует значительные дефекты как краткосрочной (А) так и долгосрочной (В) памяти (рис. 5.11, см. на вклейке). Применение теплового шока существенно увеличивает индекс обучения по краткосрочной памяти, восстанавливая ее до уровня дикого типа. Восстановление долгосрочной памяти менее значительно, однако и в этом случае различия между линией дикого типа *Canton-S* и мутантом *Agnts3* исчезают.

Полученные данные позволяют использовать мутант *Agnts3* как модель для тестирования действия пептидов на процессы обучения и сохранения памяти.

Согласно проведенным экспериментам, пептид EDR восстанавливает краткосрочную, но не долгосрочную память. Индекс обучения у мутанта *Agnts3* после воздействия пептида EDR (рис. 5.12, см. на вклейке) достоверно отличается от контрольной группы (мутант *Agnts3*) без воздействия пептида и не отличается от линии дикого типа *Canton-S* (рис. 5.11). На долгосрочную память пептид EDR не оказывает заметного эффекта — параметры долгосрочной памяти у мутанта после развития на среде с пептидом EDR продолжают оставаться достоверно ниже, чем у линии *Canton-S*, так же как и в контрольной группе (рис. 5.11).

Влияние пептида EDR на экспрессию генов *limk1*, *park*, *rok*

По результатам RealTime PCR анализа (рис. 5.13, см. на вклейке) у *Agnts3* в нормальных условиях уровень экспрессии *limk1* увеличен в 2,2 раза, уровень экспрессии *rok* повышен в 3,41 раза, а уровень *park* понижен в 1,25 раза. Уровни экспрессии всех 3 генов у *Canton-S* без воздействий приняты за единицу.

На *Canton-S* пептид EDR практически не оказывает действия. Снижение уровней экспрессии *limk1* и *rok* (0,87 и 0,82 соответственно) статистически незначимо, увеличение уровня экспрессии *park* (1,2) также слишком незначительно.

У *Agnts3* изначально повышенные уровни экспрессии *limk1* и *rok* под действием пептида EDR падают, причем уровень *limk1* почти возвращается к уровню дикого типа. Изначально пониженный уровень *park* повышается в 2 раза (от 0,8 до 1,62).

Полученные данные позволяют предположить, что пептид EDR оказывает свое влияние на локомоторное поведение и память через уменьшение уровня экспрессии *limk1*. Это хорошо согласуется с предварительными данными, полученными на трансгенных линиях мух с изменением уровня экспрессии гена *limk1*. Было показано, что эти линии способны к обучению только при нормальном уровне *limk1*, а при ее повышенной экспрессии обучения не происходит.

Что касается уменьшения уровня экспрессии *rok* и увеличения *park*, то это может воздействовать на частоту образования амилоидных отложений, но это предположение требует проведения дополнительного исследования.

Заключение

Ранее (в главах 1–4) было показано, что пептид EDR оказывает эпигенетическое влияние на экспрессию генов в нейронах млекопитающих (крысы и мыши), способствуя активации процессов нейропластичности и повышению функциональной активности нейронов головного мозга, обладает антиоксидантным действием. В данной главе представлены сходные нейропротекторные свойства пептида EDR, которые были выявлены у насекомых.

Установлено, что пептид EDR стимулирует процесс формирования способности к сохранению памяти у медоносных пчел (*Apis mellifera* L.) с исходно низкой пищевой мотивацией и ингибирует этот процесс у пчел с исходно высокой пищевой мотивацией. То есть пептид EDR обладает выраженной модулирующей способностью в зависимости от высокого или низкого условно-рефлекторного фона. Проведенные исследования позволили сделать вывод о влиянии пептида EDR на функцию высших отделов ЦНС, ответственных за когнитивную деятельность, у насекомых.

Кроме того, пептид EDR повышает локомоторную активность в модели болезни Паркинсона у *Drosophila melanogaster* (дрозофилы с деменцией и тельцами Леви – мутант Agnst3 локуса agnostic, несущего дефектный ген LIM-киназы) в нормальных условиях и при стрессорном воздействии. Пептид EDR восстанавливает краткосрочную память у мутанта Agnst3. Вероятно, что пептид EDR оказывает свое влияние на локомоторное поведение и память через уменьшение уровня экспрессии гена *limk1*.

Полученные данные могут указывать на единый механизм пептидной регуляции функций ЦНС в живой природе.

Литература

1. Бурлакова Е.Б. Особенности действия сверхмалых доз биологически активных веществ и физических факторов низкой интенсивности // Российский химический журнал. 1999. Т. XLIII, № 5. С. 3–11.
2. Захаров Г.А., Журавлев А.В., Паплина Т.Л. и др. Влияние мутаций кинуренинового пути обмена триптофана у *D. Melanogaster* на локомоторное поведение и экспрессию генов глутаматергической и холинергической системы // Экологическая генетика. 2011. Т. 9, № 2. С. 235–241.
3. Лопатина Н.Г., Зачепило Т.Г., Чеснокова Е.Г., Савватеева-Попова Е.В. Поведенческие и молекулярные последствия дефицита эндогенных кинуренинов у медоносной пчелы (*Apis mellifera* L.) // Журнал высшей нервной деятельности им. И.П. Павлова. 2010. Т. 60, № 2. С. 229–235.

4. Хавинсон В.Х., Линькова Н.С., Тарновская С.И. и др. Короткие пептиды стимулируют экспрессию серотонина в клетках коры головного мозга // Бюл. эксп. биол. и мед. 2014. Т. 157, № 1. С. 89–93.
5. Хавинсон В.Х., Лопатина Н.Г., Чалисова Н.И. и др. Трипептид модулирует условно-рефлекторную деятельность медоносной пчелы *Apis Mellifera* L. // Фундаментальные исследования. Серия Биология. 2015. № 2. С. 492–496.
6. Чалисова Н.И., Пеннийнен В.А., Ноздрачев А.Д. Стимулирующее действие малых доз ингибирующих веществ в органотипической культуре нервной и лимфоидной ткани // ДАН. 2002. Т. 383, № 2. С. 1–4.
7. Чалисова Н.И., Пеннийнен В.А., Хазе Г. Регулирующая роль некоторых аминокислот при развитии апоптоза в культуре нервной и лимфоидной ткани // Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. 2002. Т. 88, № 5. С. 627–633.
8. Agapova T.Y., Agniullin Y.V., Shadrina M.I. et al. Neurotrophin gene expression in rat brain under the action of Semax, an analogue of ACTH 4–10 // *Neurosci Lett.* 2007. Vol. 417, N 2. P. 201–205.
9. Alvarez X.A., Lombardi V.R.M., Fernandez-Novoa L. et al. Cerebrolysin reduces microglial activation in vivo and in vitro: a potential mechanism of neuroprotection // *J. Neural. Transm. Suppl.* 2000. Vol. 59. P. 281–292.
10. Bonini N.M., Fortini M.E. Human neurodegenerative disease modeling using *Drosophila* // *Annu Rev. Neurosci.* 2003. Vol. 26. P. 627–656.
11. Chen X., Ganetzky B.A. Neuropeptide signaling pathway regulates synaptic growth in *Drosophila* // *J. Cell Biol.* 2012. Vol. 196, N 4. P. 529–543.
12. Doronkin S., Reiter L.T. *Drosophila* orthologues to human disease genes: an update on progress // *Prog. Nucleic. Acid. Res. Mol. Biol.* 2008. Vol. 82. P. 1–32.
13. Ghione S., Seppia C.D., Mezzasalma L., Bonfiglio L. Effects of 50 Hz electromagnetic fields on electroencephalographic alpha activity, dental pain threshold and cardiovascular parameters in humans // *Neurosci Lett.* 2005. Vol. 382, N 1–2. P. 12–17.
14. Khavinson V.Kh., Fedoreeva L.I., Vanyushin B.F. Short peptides modulate the effect of endonucleases of wheat seedling // *Doklady Biochemistry and Biophysics.* 2011. Vol. 437. P. 64–67.
15. Khavinson V., Ribakova Y., Kulebiakin K. et al. Pinealon increases cell viability by suppression of free radical levels and activating proliferative processes // *Rejuvenation Research.* 2011. Vol. 14, N 5. P. 535–541.
16. McGonigle P. Peptide therapeutics for CNS indications // *Biochem Pharmacol.* 2012. Vol. 83, N 5. P. 559–566.
17. Pfleger C.M., Reiter L.T. Recent efforts to model human diseases in vivo in *Drosophila* // *Fly (Austin).* 2008. Vol. 2, N 3. P. 129–132.
18. Predel R., Neupert S. Social behavior and the evolution of neuropeptide genes: lessons from the honeybee genome // *BioEssays.* 2007. Vol. 29. P. 416–421.
19. Savateeva-Popova E.V., Zhuravlev A.V. et al. *Drosophila* Model for the analysis of genesis of LIM-kinase 1-dependent Williams–Beuren syndrome cognitive phenotypes: INDELS, transposable elements of the Tc1/*Mariner* superfamily and MicroRNAs // *Front. Genet.* 2017. Vol. 8. P. 1–13.

Глава 6

Перспективы практического применения пептида EDR

6.1. Эффективность перорального применения пептида EDR в сочетании с другими короткими пептидами у спортсменов

6.1.1. Эффективность перорального применения пептида EDR в сочетании с другими короткими пептидами у спортсменок высокой квалификации по художественной гимнастике

Одним из перспективных способов создания новых препаратов, способствующих повышению защитных функций организма, физической и умственной работоспособности, выносливости, является применение коротких пептидов. Создание лекарственных препаратов на основе коротких пептидов (пептидная биотехнология) в настоящее время становится ведущим в деятельности зарубежных фармацевтических компаний.

В числе наиболее перспективных направлений спортивной фармакологии – применение лекарственных средств и парафармацевтиков, являющихся аналогами эндогенных регуляторных пептидных факторов. В Санкт-Петербургском институте биорегуляции и геронтологии разработана методика повышения резервных возможностей организма гимнасток путем индивидуального подбора комплекса пептидных биорегуляторов с учетом генетической предрасположенности организма спортсменок к развитию заболеваний, а также их биологического возраста. Один из компонентов этого комплекса – нейропротекторный пептид EDR, входящий в состав биологически активной добавки Пинеалон.

С целью повышения резервных возможностей организма гимнасток были применены следующие пептидные биорегуляторы – Пинеалон (EDR, нейропротектор), Везуген (KED, вазопротектор),

Панкраген (KEDW, пептид, нормализующий функции поджелудочной железы) и Кристаген (EDR, иммуномодулятор).

Объект исследования – спортсменки высокой квалификации по художественной гимнастике (20 чел.). После комплексного обследования методом стратификационной рандомизации все гимнастки были разделены на 2 группы. Основная группа спортсменок (10 чел.) получала физиологически активные вещества – пептиды в виде биологически активных добавок, вторая группа (10 чел.) была контрольной и находилась на обычном режиме.

Пептидные биорегуляторы были подобраны индивидуально для каждой спортсменки основной группы в зависимости от выявленной генетической предрасположенности к развитию заболеваний. Всем спортсменкам основной группы с учетом выявленного риска возникновения онкологических заболеваний (мутации генов L-MYC, p53-6, p53-16, p53-72, CYP-19, GSTM1) и с целью повышения стрессоустойчивости (даже при отсутствии мутаций генов DRD-2A и DRD-2B, которые отвечают за повышенную чувствительность организма к воздействию стресса) был назначен Кристаген. В зависимости от степени выраженности риска тех или иных соматических заболеваний, в комбинации с Кристагеном был назначен Везуген (при наличии генных мутаций, повышающих риск развития атеросклероза и сердечно-сосудистых заболеваний, – 4 чел.), Пинеалон (при наличии генных мутаций, повышающих риск развития болезни Альцгеймера, – 4 чел.) и двум гимнасткам с повышенным риском развития сахарного диабета II типа был назначен Панкраген. Все обследуемые основной группы получали пептидные биорегуляторы во время еды по 1 капсуле 2 раза в день в течение 20 дней каждого из назначенного препарата. Обследуемые контрольной группы не получали пептидные биорегуляторы и находились на обычном режиме.

Все спортсменки основной и контрольной групп были обследованы специалистами (терапевт, кардиолог) с применением новейших медицинских технологий, включая молекулярно-генетическое исследование (генетический паспорт), проведение тредмилл-тестирования, клинических, биохимических, иммунологических исследований крови, оценку анти- и прооксидантной системы, оценку биологического возраста (уровень мелатонина).

Исследование иммунной системы включало в себя изучение показателей Т-, В-клеточного звеньев и неспецифической резистентности. Показатели Т-клеточного звена оценивали по относительной и абсолютной шкале. Содержание клеток определяли методом непрямой иммунофлуоресценции с моноклональными

антителами. Для выявления активированных Т-, В-лимфоцитов и моноцитов определяли CD25⁺, CD71⁺ и HLA DR⁺ клеток.

Молекулярно-генетические исследования проводили методом ПЦР в реальном времени. Для каждой пациентки оценивали уровень экспрессии пяти генов, участвующих в иммунном ответе: ген гамма-интерферона IFNG, ген рецепторного белка CD40, ген белка теплового шока HSPA1A, ген рецептора интерлейкина IL2RB и ген IL6. Изменение экспрессии генов определяли на фоне приема биорегуляторов (1 измерение – до начала приема биорегуляторов, 2 измерение – после приема) и в контрольной группе (также 2 измерения) по сравнению с контрольным геном-стандартом (ген GAPDH), который экспрессируется на постоянном уровне независимо от каких-либо воздействий на организм. Изменения уровней экспрессии всех исследуемых генов определяли как средние по выборкам разности пороговых циклов флуоресценции, нормированные по гену-стандарту. Достоверность различий выборок оценивали с использованием автоматического расчета U-критерия Манна–Уитни.

Влияние пептида EDR в сочетании с другими короткими пептидами на общее состояние и иммунную систему спортсменок

У большинства гимнасток основной группы при повторном обследовании отмечали улучшение самочувствия, сна, психоэмоционального состояния, которое проявлялось в хорошем настроении с более редкими его перепадами.

Проведенная коррекция комплексом пептидных биорегуляторов оказала оздоравливающий эффект на спортсменок. Необходимо отметить, что данная научно-исследовательская работа проводилась в период сезонной эпидемии гриппа, однако во время приема пептидных биорегуляторов большинство спортсменок (80%) не заболели гриппом или ОРЗ. Данное положение было подтверждено результатами иммунологического исследования.

При первичном обследовании были выявлены разнонаправленные умеренные изменения количественных характеристик Т-лимфоцитов у 22% обследуемых спортсменок, что свидетельствовало о тенденции к некоторому снижению активности Т-клеточного звена иммунной системы. Клинических корреляций с таким состоянием лабораторных показателей выявлено не было. При этом наблюдалось изменение функциональной активности этих клеток – умеренное снижение выработки цитокинов при оценке спонтанной миграции лейкоцитов (у 72% пациенток), при стиму-

ляции митоза лейкоцитов конканавалином А (преимущественно CD8⁺ клетки) и фитогемагглютинином (ФГА, CD4⁺ клетки). Такие показатели (55% и 32% обследуемых соответственно) свидетельствовали об активизации иммунного ответа на инфекционную агрессию. Наряду с этим у 8 человек было обнаружено увеличение содержания CD3⁺ клеток, что не сопровождалось изменением уровня иммуноглобулинов и не было связано с признаками воспаления.

Иммунорегуляторный индекс (соотношение основных субпопуляций) был в пределах нормы у большей половины обследуемой группы. 12% имели сниженный иммунорегуляторный индекс, 33% – повышенный. При этом у 34% пациенток выявлено снижение относительного и абсолютного содержания В-клеток. У большей части из них эти изменения носили характер тенденции, у 6% изменения имели выраженный характер. Однако выработка иммуноглобулинов В-клетками имела разнонаправленный характер. У 9 спортсменок было выявлено снижение выработки секреторного IgA. У одной пациентки снижение В-клеток сопровождалось снижением всех классов иммуноглобулинов. Увеличение содержания острофазового IgM отмечалось в 11% случаев. У 8 человек было выявлено повышение IgG. Значительное увеличение IgE (склонность к аллергизации) было обнаружено у 4 пациенток. У всех отмечались анамнестические указания на заметную склонность к аллергическим реакциям различной степени выраженности. Что касается неспецифической резистентности, то фагоцитарная и микробоцидная активность нейтрофилов и моноцитов была не изменена, что коррелировало с данными, полученными при изучении параметров клеточного иммунитета.

Результаты исследования иммунного статуса у гимнасток основной группы выявили позитивные изменения содержания активационных маркеров, что подтверждает развитие адекватного иммунного ответа на введение пептидных биорегуляторов. Результаты динамического лабораторного контроля показали заметное увеличение содержания CD25⁺, CD71⁺, HLA DR⁺ клеток. Отмечалось повышение содержания Т-, В- и NK-клеток. Выявлена нормализация содержания иммуноглобулинов классов М, G и E. В итоге было получено изменение соотношения основных субпопуляций лимфоцитов и оптимизация их функциональной активности.

Таким образом, по результатам мониторинга основных показателей иммунитета на фоне применения пептидных биорегуляторов, в том числе пептида EDR, была отмечена оптимизация деятельности всех звеньев иммунной системы. Следовательно, пептидные биорегуляторы обладают выраженным иммуномодулирующим действием.

Влияние пептида EDR в сочетании с другими короткими пептидами на антиоксидантную систему спортсменов

Спортивный стресс носит комплексный характер и включает в себя эмоциональное напряжение, физическое утомление, рабочую гипертермию, гипоксию и ацидоз. Систематическое избыточное накопление в организме продуктов ПОЛ способствует развитию в органах выраженных дистрофических и атрофических нарушений, ускоряя процессы старения и увеличивая биологический возраст организма. Применение пептидных биорегуляторов привело к улучшению показателей системы антиоксидантной защиты за счет уменьшения содержания продуктов перекисного окисления липидов и активации компенсаторно-приспособительных реакций, в результате которых в организме происходит более экономное расходование липидов (табл. 6.1). Полученные данные

Таблица 6.1

Влияние пептидных биорегуляторов на систему антиоксидантной защиты в сыворотке крови у спортсменов

Показатель	Норма	До пептидной коррекции		После пептидной коррекции	
		Контрольная группа	Основная группа	Контрольная группа	Основная группа
Антирадикальная активность, мкМ	760–900	869,5 ± 29,2	892,8 ± 29,5	876,4 ± 27,4	866,1 ± 25,2
Первичные конъюгированные гидроперекиси, мкМ/л	2,70–4,10	4,31 ± 0,8	4,44 ± 0,4	4,22 ± 0,5	3,90 ± 0,5 *#
Шиффовые основания, усл.ед./л	200–400	374,0 ± 15,0	386,3 ± 17,9	343,1 ± 19,0	370,0 ± 13,6
Активность общей супероксиддисмутазы, усл.ед./мл	31,3–45,3	31,4 ± 2,0	32,3 ± 2,2	33,1 ± 1,8	32,9 ± 1,8
Активность глутатионпероксидазы, мМ GSH/мг б. мин	2,3–2,9	2,4 ± 0,1	2,4 ± 0,1	2,5 ± 0,1	2,4 ± 0,08

Примечание: * – $p < 0,05$ по сравнению с соответствующим показателем до пептидной коррекции; # – $p < 0,05$ по сравнению с соответствующим показателем в контроле.

свидетельствуют о том, что пептидные биорегуляторы, в том числе пептид EDR, регулируют процессы метаболической перестройки в организме спортсменов при воздействии интенсивной физической нагрузки, при этом не оказывая стимулирующего или подавляющего действий.

Влияние пептида EDR в сочетании с другими короткими пептидами на сердечно-сосудистую систему спортсменов

Наиболее значимые изменения со стороны сердечно-сосудистой системы (ССС) были зафиксированы при проведении функционального тестирования (тредмилл-исследование) только у двух спортсменок основной группы. У остальных девушек были выявлены в той или иной степени признаки напряженности процессов адаптации со стороны ССС.

Молекулярная идентификация аллельных вариантов исследованных соматических генов позволила выявить у этих двух гимнасток генетическую предрасположенность к развитию атеросклероза и ССС (Apo E, ApoСIII, PON1, ACE). Запредельные физические нагрузки на фоне стресса могли спровоцировать функциональные нарушения со стороны ССС, особенно при генетической предрасположенности к развитию сердечно-сосудистых заболеваний. Однако применение пептидных биорегуляторов, подобранных с учетом генетической предрасположенности к развитию заболеваний, способствовало улучшению работы и повышению резервных возможностей сердечно-сосудистой системы у этих гимнасток.

При проведении повторного тредмилл-тестирования у гимнасток основной группы на фоне по-прежнему высокой их толерантности к физической нагрузке отмечена положительная динамика в системе вегетативного управления системой кровообращения в процессе адаптации к высоким физическим нагрузкам. В отдельных случаях это было выражено в более адекватной реакции на повышение нагрузки в системе ЧСС–АД. В большинстве исследований зарегистрирована тенденция к снижению фонового и нагрузочного диастолического артериального давления. Это свидетельствует о положительном влиянии пептидных биорегуляторов, в том числе пептида EDR, на восстановительный период у спортсменок в постсоревновательный период.

Геностимулирующий эффект пептида EDR в сочетании с другими короткими пептидами у спортсменов

Одним из основных маркеров активации адаптивных процессов в клетке являются белки теплового шока (БТШ), которые относятся к группе шаперонов. С возрастом способность клеток синтезировать БТШ-70 снижается, и это считают одним из возможных механизмов клеточного старения. Таким образом, БТШ являются универсальным неспецифическим ответом клетки на стрессовое воздействие. Увеличение экспрессии БТШ свидетельствует о запуске неспецифических защитных процессов в лейкоцитах, направленных на сохранение и активацию белкового неосинтеза и предотвращение возможных нарушений синтеза и фолдинга белков под действием физиологического стресса, вызванного, в том числе, высокой физической нагрузкой. Через данный механизм усиливается защита клеток от гипоксического и симпат-адреналового повреждения, развивающегося во время наибольших физических нагрузок. Так же происходит активация белкового неосинтеза, в том числе и в мышечной ткани, что способствует эффективности тренировок. Помимо этого, БТШ участвуют в борьбе со стрессом, неизбежно сопровождающим спорт высоких достижений.

Полученные нами результаты согласуются с данной гипотезой и свидетельствуют о том, что под действием пептидных биорегуляторов экспрессия гена HSPA1A, который кодирует БТШ-70, увеличилась в среднем в 2,2 раза по сравнению с исходной.

Изменения уровней экспрессии всех исследуемых генов (IFNG, CD40, HSPA1A, IL2RB, IL6) представлены в табл. 6.2.

Таблица 6.2

Средние значения изменения экспрессии исследуемых генов (в циклах)

Ген	Основная группа		Контрольная группа	
	До приема ПБ	После приема ПБ	Первичное измерение	Повторное измерение
IFNG	3,0 ± 0,15	3,4 ± 0,12	3,6 ± 0,14	4,4 ± 0,10
CD40	5,2 ± 0,10	5,1 ± 0,21	5,3 ± 0,14	5,6 ± 0,12
HSPA1A	1,9 ± 0,13	4,4 ± 0,15*#	2,3 ± 0,08	2,0 ± 0,16
IL2RB	3,0 ± 0,21	2,7 ± 0,21	2,4 ± 0,14	2,8 ± 0,11
IL6	6,7 ± 0,17	6,2 ± 0,13	7,4 ± 0,11	8,4 ± 0,24

Примечание: ПБ – пептидные биорегуляторы; * – $p < 0,05$ по сравнению с соответствующим показателем до пептидной коррекции; # – $p < 0,05$ по сравнению с соответствующим показателем в контрольной группе.

При применении Пинеалона, Везугена, Панкрагена и Кристагена побочных реакций, осложнений или лекарственной зависимости выявлено не было. Препараты хорошо переносились спортсменками и были совместимы со всеми лекарственными веществами, используемыми в комплексном лечении сопутствующих соматических заболеваний.

Результаты данного исследования позволили разработать методику повышения резервных возможностей организма спортсменов в зависимости от их генетических возможностей. Оценка генетической предрасположенности к развитию соматических и онкологических заболеваний позволяет целенаправленно подойти к коррекции выявленных изменений и подобрать индивидуальный комплекс пептидных биорегуляторов с учетом их геноспецифичности. В свою очередь, способность пептидных биорегуляторов регулировать экспрессию генов позволит повысить резервные возможности организма спортсменов и добиться большей физической готовности и психологической устойчивости во время тренировочного процесса и соревнований.

Таким образом, применение комплекса пептидных биорегуляторов, индивидуально подобранных для каждой спортсменки с учетом генетической предрасположенности организма к развитию заболеваний, позволит улучшить их физическое состояние и повысить физиологические резервные возможности организма спортсменов. Разработанная методика была внедрена в тренировочный процесс сборной команды РФ по художественной гимнастике (рис. 6.1, см. на вклейке).

6.1.2. Эффективность перорального применения пептида EDR в сочетании с другими короткими пептидами у спортсменов высокой квалификации, специализирующихся в циклических видах спорта

Цель исследования – повышение резервных возможностей организма гребцов путем разработки методики индивидуального подбора комплекса пептидных биорегуляторов с учетом генетической предрасположенности организма спортсменов к развитию заболеваний и их биологического возраста. Для повышения резервных возможностей организма гребцов использовали пептидные биорегуляторы иммунной (Кристаген) или нервной (Пинеалон) систем. Как уже упоминалось, активным началом биологически активной добавки Пинеалон является пептид EDR.

Для решения поставленной цели были проведены клинические исследования у 28 спортсменов высокой квалификации в возрасте от 18 до 30 лет, специализирующихся в циклических видах спорта, уровень мастерства – кандидаты в мастера и мастера спорта. Исследования были выполнены в естественных климато-географических условиях (широта 59°52', долгота 30°25') на гребной базе НГУ им. П.Ф. Лесгафта. Среди обследуемых были 18 мужчин и 10 женщин (табл. 6.3).

После комплексного обследования все гребцы методом стратификационной рандомизации были разделены на 2 группы. Основная группа спортсменов (14 чел.) получала физиологически активные вещества – пептиды в виде биологически активных добавок, вторая группа (14 чел.) – была контрольной и находилась на обычном режиме. Все исследуемые основной группы получали пептидные биорегуляторы во время еды по 1 капсуле 2 раза в день в течение 10 дней. Исследуемые контрольной группы не получали пептидные биорегуляторы и находились на обычном режиме.

Все спортсмены основной и контрольной групп были обследованы специалистами (терапевт, кардиолог) с применением новейших медицинских технологий, включая молекулярно-генетическое исследование (генетический паспорт), клинических, биохимических, оценку анти- и прооксидантной системы.

Комплексное обследование включает:

1. Молекулярно-генетическое исследование 21 гена (генетический паспорт) – комплексное определение структурной организации генетических детерминант, определяющих эффективность функционирования сердечно-сосудистой системы, характер обменных и регуляторных процессов, а также риска развития патологических изменений при гипернагрузках у спортсменов высокой квалификации. Определение экспрессии генов производилось методом ПЦР в реальном времени.

Таблица 6.3

Характеристика выборки спортсменов, принявших участие в эксперименте

Группа	Пол	Количество, чел.	Средний рост, м	±σ, м	Средний вес, кг	±σ, м
Основная	Жен.	7	1,80	0,03	73,0	2,5
	Муж.	7	1,90	0,05	89,8	7,6
Контрольная	Жен.	3	1,78	0,04	69,0	8,6
	Муж.	11	1,90	0,05	83,6	10,1
Всего		28				

2. Общий анализ крови, который показывает количественные изменения содержания клеток крови: лейкоцитов, эритроцитов, тромбоцитов; скорости оседания эритроцитов, гемоглобина и других показателей. При помощи этого анализа можно судить о наличии анемии, эритремии, воспалительных и онкологических процессах, аллергических реакциях, уровне кроветворения, функционировании свертывающей системы крови, созревании клеток крови, истощении адаптационных систем. Этот анализ является отправным для детализации дальнейшего обследования, показывающего наличие воспалительных процессов в организме.

3. Биохимические исследования уровня глюкозы, билирубина, аланинаминотрансферазы, аспаратаминотрансферазы, молочной кислоты, общего белка, холестерина, триглицеридов и кальция, как показателей, наиболее информативных при высоких физических нагрузках.

4. Определение антиоксидантных и прооксидантных показателей, свидетельствующих о патологических изменениях механизмов клеточной защиты органов и тканей, а именно, антирадикальная активность, активность общей супероксиддисмутазы, активность глутатионпероксидазы, содержание продуктов спонтанного перекисного окисления липидов (первичных и конечных).

5. Определение уровня гормонов и метаболитов, позволяющих оценить гормональный статус в условиях гипернагрузки у спортсменов. В исследовании был определен уровень кортизола, соматотропина, эритропоэтина, альдостерона.

6. Исследование сердечно-сосудистой системы – консультация кардиолога. Для оценки сердечной деятельности использовалось электрокардиографическое исследование.

7. Определение длины теломер методом флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH).

8. Оценка специальной физической и функциональной подготовленности.

Спортивный результат в академической гребле, как и во многих других циклических видах спорта (плавание, велоспорт, лыжные гонки, конькобежный спорт, гребля на байдарках и каноэ), определяется способностью спортсменов производить высокую механическую мощность на протяжении всей гоночной дистанции. В процессе выполнения физической работы, соревновательной или тренировочной направленности, интерес представляет степень активации того или иного механизма энергообеспечения. В этом случае ориентируются на две величины, в значительной мере отражающие уровень подготовленности спортсменов: критическую мощ-

ность и мощность, соответствующую порогу анаэробного обмена (ПАНО).

Критическая мощность – минимальная интенсивность физической работы, при которой достигается МПК. Такая работа характеризуется состоянием организма человека, когда кислородный запрос равен предельным аэробным возможностям организма и выполняется в условиях максимального напряжения дыхательной и циркулярной систем.

Очевидно, что критическая мощность тем выше, чем больше дыхательные возможности спортсмена. Критерием определения критической мощности является прекращение роста потребления кислорода, несмотря на увеличение интенсивности работы при выполнении ступенчато-возрастающей нагрузки. В циклических видах спорта величину мощности на уровне порога анаэробного обмена, развиваемой при выполнении специфической работы, считают критерием работоспособности.

Для измерения аэробной и соревновательной (смешанная аэробно-анаэробная) мощностей спортсменов использовался гребной эргометр Concept2 Model E. Воздушная заслонка эргометра была установлена на деление 4 таким образом, чтобы величина коэффициента сопротивления DF составила 128–130. Электронный блок гребного эргометра PM4 был подключен к портативному компьютеру (ПК) через USB порт. На основе прикладного пакета для создания приложений PMI была разработана специальная программа (рис. 6.2), которая в реальном времени после каждого гребка получала данные о мощности гребли и ЧСС спортсмена и записывала их в файл на ПК.

Аэробная мощность оценивалась в ступенчато-возрастающем тесте 6 (женщины и мужчины легкого веса) или 7 (мужчины) отрезков по 3 минуты с интервалом в 1 минуту, во время которого фиксировались показатели насыщения крови кислородом. Величина мощности, которая задавалась в ступенчато-возрастающем тесте, показана в табл. 6.4.

Компьютерная программа для проведения степ-теста получала данные за каждый выполненный гребок, фильтровала их на наличие сбоев и вычисляла величины средней мощности и ЧСС за последнюю минуту каждого 3-минутного отрезка, которые и использовались для проведения оценки специальной работоспособности.

Соревновательная смешанная (аэробно-анаэробная) мощность оценивалась в максимальном тесте на гребном эргометре Concept2 на дистанции 2 км, при котором фиксировались время прохождения, темп гребли, мощность, ЧСС и уровень насыщения крови кислородом с использованием прибора Nonin. Соревновательный

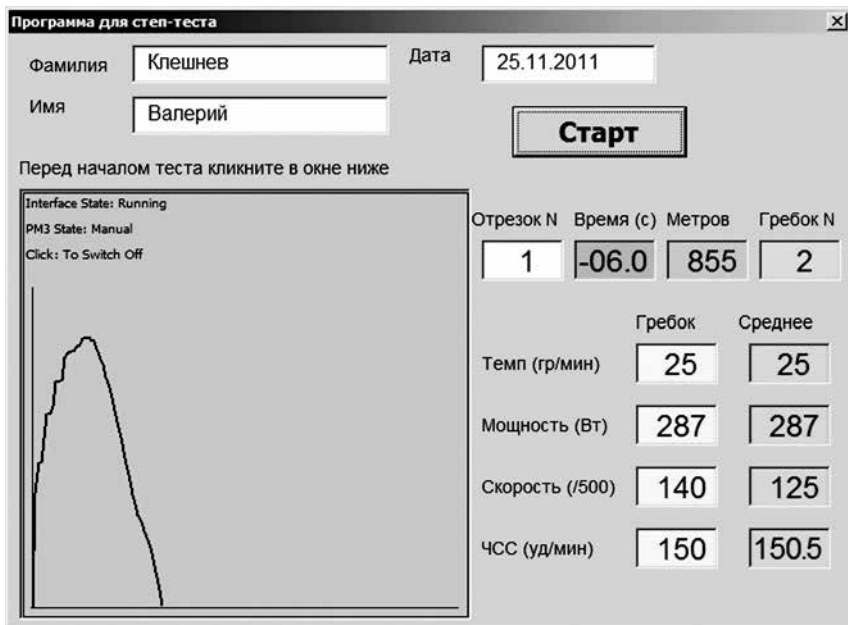


Рис. 6.2. Вид окна программы для проведения степ-теста на гребном эргометре Concept2

Таблица 6.4

Величина мощности в ступенчато-возрастающем тесте

№ ступени	Мощность, Вт	
	Женщины	Мужчины
1	100	150
2	150	200
3	200	250
4	250	300
5	300	350
6	350	400
7	400	450

тест на гребном эргометре, имитирующий прохождение гоночной дистанции, является интегральным показателем специальной подготовленности спортсмена к академической гребле, тесно связанным со спортивным результатом на воде. Этот тест был включен в программу эксперимента для оценки суммарного эффекта развития различных компонентов специальной работоспособности.

Частота сердечных сокращений (ЧСС) каждого спортсмена измерялась с помощью датчика типа Garmin, который надевался на грудь спортсмена и подключался по беспроводному протоколу ANT+ к электронному блоку PM4 гребного эргометра.

Уровень лактата La в крови определялся после каждого отрезка теста с помощью портативного прибора Lactate Pro и выражался в ммоль/л.

Другими важными компонентами специальной подготовленности являются объем основных рабочих групп мышц и их сила. Поэтому в программу данного исследования были включены два теста на специфические силовые качества гребцов: тяга штанги лежа на доске и приседания со штангой.

Организация эксперимента и параметры тренировочной нагрузки

Все спортсмены основной и контрольной групп были протестированы в течение одной недели по трем разделам специальной подготовленности, указанным выше. Затем все спортсмены в течение четырех недель выполняли одинаковые тренировочные нагрузки.

Тренировочный план входил как накопительный аэробно-силовой мезоцикл в общий план годичного цикла подготовки к сезону 2011/12 года. Общий объем тренировочной нагрузки за четыре недели эксперимента составил $62,4 \pm 3,5$ часов. Различия в тренировочной нагрузке между основной и контрольной группами были незначительны и статистически недостоверны.

В процессе физикального осмотра патологий внутренних органов ни у одного из обследуемых выявлено не было. Никто из обследуемых не предъявлял существенных жалоб на момент осмотра. Никто не состоял на динамическом учете по поводу хронических заболеваний. Из анамнеза известно, что все обследуемые в течение года перенесли острое респираторное заболевание в соревновательный период. Аллергологический анамнез, со слов обследуемых, был без особенностей.

Все обследуемые в анамнезе имели растяжения связок, травмы средней и легкой степени опорно-двигательного аппарата. Однако на момент обследования видимых телесных повреждений не было.

Кожные покровы были нормальной окраски, чистые, нормальной влажности. Видимые слизистые были розового цвета, чистые, влажные. Дермографизм определялся — разлитой, нестойкий,

розовый. Состояние придатков кожи являлось удовлетворительным. Тургор мягких тканей был сохранен, периферических отеков не было.

Дефектов развития выявлено не было. Все спортсмены были правильного телосложения, удовлетворительного питания. Грудная клетка была цилиндрической формы, симметрично развита, без деформации. Изгибы позвоночника были выражены достаточно. Болезненность при пальпации и перкуссии грудины, трубчатых костей, позвоночника отсутствовала. Конфигурация суставов не была изменена. Гипертермии, гиперемии, болезненности суставов не отмечалось. Одноименные суставы симметричны, объем активных и пассивных движений достаточен.

Область сердца визуально ни у одного из обследуемых не была изменена. Визуально сердечный толчок, патологическая пульсация вен шеи, эпигастральной области отсутствовали. Пальпаторно сердечный толчок не определялся. Верхушечный толчок был ограничен, локализован в 5-м межреберье на 1,5 см внутри от *l. mediaclavicularis sinistra*, удовлетворительного напряжения и высоты. Пульс на *a. radialis* у всех обследуемых был симметричный, ритмичный, с частотой $57,0 \pm 1,4$ ударов в минуту, удовлетворительного наполнения и напряжения. Пульс на сонной, бедренной, задней большеберцовой артериях и артериях тыла стопы также был симметричен. Эпигастральная пульсация пальпаторно определялась спереди назад. Перкуторно границы сердца были в пределах нормы. Аускультативно в классических точках выслушивались тоны сердца: ритмичные, звучные, компактные, чистые, соотношение правильное. Над всей поверхностью сердца и в экстракардиальных точках патологических шумов не определялось. АД составило $116,0 \pm 1,19/73,0 \pm 1,25$ мм рт. ст. на обеих руках.

Дыхание было свободным с частотой 14–15 в минуту. Эластичность грудной клетки сохранена. Голосовое дрожание симметрично проводилось на всю поверхность легких. Верхушки легких симметрично выступали над ключицами на $4,0 \pm 0,3$ см. Границы нижнего края легких были в пределах нормы. Подвижность нижнего легочного края по *l. scapularis* составляла $6,0 \pm 0,45$ см с обеих сторон. Перкуторно над всей поверхностью легких определялся ясный легочный звук. Аускультативно дыхание было везикулярным, проводилось во все отделы легких.

Язык был влажным, чистым, розовым, живот правильной формы симметрично участвовал в акте дыхания. При поверхностной пальпации зон кожной гиперэстезии и мышечной защиты не определялось. При глубокой скользящей методической пальпации по Образцову—Стражеско патологии выявлено не бы-

ло. Печень не выступала из-под края реберной дуги, нижний край был мягкоэластичный, безболезненный. Перкуторно размеры по Курлову были в пределах нормы. Селезенка не пальпировалась. По передней поверхности брюшной стенки определялся мозаичный перкуторный тон. Аускультативно выслушивались активные шумы перистальтики. Область почек визуально была не изменена. Наружные мочеполовые органы сформированы по изосексуальному типу. Пальпация почек безболезненна. В положении лежа пальпировался нижний полюс правой почки, мягкоэластичный, безболезненный. Патологической подвижности почек не определялось. Мочевой пузырь пальпаторно и перкуторно не выступал над лоном. Пальпация мочеточниковых точек была безболезненна, симптом поколачивания по пояснице был отрицательный. Щитовидная железа визуально и пальпаторно ни у кого не была увеличена. Физиологические отправления, со слов обследуемых, были не нарушены.

В процессе вторичного физикального осмотра (после приема пептидных биорегуляторов) данных о патологии внутренних органов ни у одного спортсмена выявлено не было. Никто из обследуемых не предъявлял жалоб на момент осмотра.

Большинство спортсменов из основной группы стали отмечать повышение физической работоспособности и выносливость. Практически все обследуемые отметили факт быстроты засыпания или легкости подъема. Гребцы контрольной группы не отметили существенных изменений в своем самочувствии.

Пульс на момент осмотра у всех спортсменов был $57,0 \pm 0,4$, равномерный, ритмичный, не напряжен, хорошего наполнения. Пульсация периферических сосудов у всех обследуемых была сохранена. Область верхушечного толчка визуально и пальпаторно была не изменена. Тоны сердца – удовлетворительной звучности. АД $113 \pm 2,11/72 \pm 3,1$ мм рт. ст.

Частота дыхания в среднем была 15–17 в минуту. У всех спортсменов грудная клетка равномерно участвовала в акте дыхания, межреберные промежутки расширены не были, подвижность нижних легочных краев была достаточная. Перкуторно над легкими определялся ясный легочный звук, аускультативно – дыхание было везикулярное с обеих сторон.

Язык был влажным, чистым. Живот – правильной формы, мягкий, доступен пальпации во всех отделах, безболезненный. Печень перкуторно и пальпаторно не была увеличена. Селезенка, почки не пальпировались. Поколачивание по поясничной области было безболезненно с обеих сторон. Щитовидная железа визуально

и пальпаторно ни у кого не была увеличена. Физиологические отправления, со слов обследуемых, были не нарушены.

Молекулярная идентификация аллельных вариантов генов у гребцов основной и контрольной групп позволила выявить генетическую предрасположенность к развитию атеросклероза у 4 обследуемых, генетическую предрасположенность к тромбозам у 9 человек, причем у 2 человек риск развития тромбозов очень высок. У 7 обследуемых выявлена предрасположенность к развитию сахарного диабета II типа, склонность к развитию артериальной гипертензии и ИБС – у 6 человек, возможность развития болезни Альцгеймера у 6 человек.

Результаты исследования экспрессии гена HSPA1A сравнивались с эталоном: генами Housekeeping, которые экспрессируются во всех клетках организма на относительно постоянном уровне. Они обеспечивают процесс гликолиза, биосинтез аминокислот и нуклеотидов, катаболизм белков и т. п., их используют в качестве стандарта (нормализатора) поскольку на их экспрессию не влияют условия эксперимента.

Экспрессия исследуемых генов представлена в табл. 6.5. Значения приведены в виде разности количества циклов (усл. ед.) исследуемого гена и стандарта (*Housekeeping gene*). Таким образом, сравнивая данные показатели до и после применения пептидных биорегуляторов, можно судить об изменении экспрессии исследуемых генов под воздействием биорегулирующей терапии. Уменьшению данного показателя на каждые 3 цикла соответствует увеличение экспрессии исследуемого гена в 10 раз.

В результате проведенного исследования было выявлено увеличение экспрессии гена белка теплового шока HSPA1A после применения пептидных биорегуляторов, в то время как в контрольной группе зафиксирована тенденция к ее снижению. Проведенные исследования выявили способность исследуемых пептидных биорегуляторов увеличивать экспрессию гена HSPA1A.

Таблица 6.5

Средние значения экспрессии гена HSPA1A у гребцов (циклы)

Ген	Основная группа		Контрольная группа	
	До приема ПБ	После приема ПБ	Первичное измерение	Повторное измерение
HSPA1A	0,91 ± 0,09	0,67 ± 0,06*#	0,74 ± 0,04	0,77 ± 0,03

Примечание: * – $p < 0,05$ по сравнению с соответствующим показателем до пептидной коррекции; # – $p < 0,05$ по сравнению с соответствующим показателем в контроле; ПБ – пептидные биорегуляторы.

При оценке результатов клинического исследования крови у 2 обследуемых было выявлено повышение количества лимфоцитов, что свидетельствует о инфекционном процессе. У 1 спортсмена наблюдалось повышение количества ретикулоцитов, которое можно рассматривать как приспособительную реакцию организма. Остальные показатели периферической крови находились в пределах нормы (табл. 6.6). При повторной оценке результатов клинического исследования крови спортсменов после пептидной коррекции все показатели периферической крови были в пределах нормы.

Исследование оксидативного статуса гребцов. Общая антирадикальная активность была снижена у 6 спортсменов. У подавляющего числа спортсменов активность глутатионпероксидазы соответствовала нормальным величинам, в то время как активность супероксиддисмутазы была снижена у 9 гребцов. У 5 спортсменок было выявлено умеренное повышение содержания первичных продуктов ПОЛ, у 1 – повышение конечных шиффовых оснований.

Результаты контрольных исследований показали, что применение пептидных биорегуляторов оказывает положительное влияние на течение процессов ПОЛ, сопровождающееся уменьшением и нормализацией содержания как первичных, так и конечных продуктов перекисного окисления липидов. Полученные результаты дают основание предположить, что эти препараты могут быть включены в систему подготовки спортсменов высокой квалификации.

Таблица 6.6

Результаты клинического анализа крови у гребцов до и после пептидной коррекции

Показатель	Норма	До пептидной коррекции		После пептидной коррекции	
		Контроль	Основная группа	Контроль	Основная группа
Гемоглобин, г/л	120–160	137 ± 21,4	136,1 ± 27,4	141,6 ± 26,1	134,4 ± 32,2
Эритроциты, × 10 ¹² /л	3,9–5,0	4,6 ± 0,32	4,4 ± 0,2	4,7 ± 0,3	4,3 ± 0,4
ССГ	27,0–33,3	28,5 ± 0,8	30,2 ± 1,11	29,3 ± 1,12	31,2 ± 1,2
Лейкоциты, × 10 ⁹ /л	4,0–9,0	5,9 ± 0,9	5,2 ± 0,7	5,8 ± 0,4	5,1 ± 0,3
Сегментоядерные, %	47,0–72,0	62,8 ± 3,3	67,5 ± 2,7	62,3 ± 4,7	66,4 ± 4,4
Ретикулоциты, %	0,5–1,5	0,8 ± 0,12	0,75 ± 0,34	0,8 ± 0,6	0,8 ± 0,9
СОЭ, мм/ч	2,0–15,0	5,3 ± 0,5	6,4 ± 0,21	6,2 ± 0,5	7,4 ± 0,3

У спортсменов контрольной группы не было выявлено достоверных изменений в системе антиоксидантной защиты крови.

Исследование длины теломер. В группе женщин-спортсменов 50% обследуемых (5 из 10) имели превышение длины теломер, характеризующее позитивный вариант биологического возраста, при котором биологический возраст меньше статистического. Предположительно, у таких спортсменов по критерию длины теломер должен наблюдаться высокий антивозрастной эффект физической активности. У 4 спортсменок (40%) биологический возраст соответствовал статистическому. Их антивозрастной эффект физической активности может быть расценен как средний. Укорочение теломер меньше диапазона статистического возраста наблюдалось у 1 (10%) спортсменки.

В мужской группе спортсменов по академической гребле наблюдались сходные по сравнению с женской группой соотношения высокой и средней физической активности. У 62% (11 из 18) обследуемых длина теломер превышала расчетный диапазон статистического возраста, свидетельствуя о меньшем биологическом возрасте по сравнению со статистическим. У 6 (33%) спортсменов биологический возраст соответствовал статистическому. Вариант укорочения длины теломер меньше длины теломер статистического возраста наблюдался у 1 (5%) спортсмена.

Проведенные нами исследования по оценке длины теломер клеток мононуклеарной фракции периферической крови профессиональных спортсменов по академической гребле показали различное распределение антивозрастного эффекта физической активности (табл. 6.7).

Результаты анализа теломерного теста показали, что длина теломер у 57% обследуемых спортсменов превышала диапазон статистического возраста (область положительных значений биологического возраста), что может коррелировать с высокой переносимостью физических нагрузок. У 36% спортсменов длина теломер соответствовала статистическому возрасту (вариант соответствия

Таблица 6.7

Распределение антивозрастного эффекта физической активности по критерию длины теломер

Вид спорта	Пол	Кол-во спортсменов в группе	Распределение эффекта физической активности в группах, %		
			высокий	средний	низкий
Академическая гребля	Мужчины	18	62	33	5
	Женщины	10	50	40	10

биологического возраста статистическому). Вполне вероятно, что антивозрастной эффект физической активности по критерию длины теломер в этом случае может расцениваться как менее выраженный или средний. У 7% наблюдалось укорочение теломер ниже пределов диапазона статистического возраста, что свидетельствует о низком антивозрастном эффекте физической активности (развитии утомляемости).

Полученные данные позволяют заключить, что состояния повышенной утомляемости и адаптации к тренировочным нагрузкам различным образом отражаются на средней длине теломер лейкоцитарной фракции периферической крови. Динамика изменений теломерного теста, вероятно, может использоваться в качестве критерия переносимости тренировочных нагрузок. Для детального анализа установленных закономерностей нужны дальнейшие углубленные исследования по изучению корреляционной структуры длины теломер и стадий тренировочного цикла, индивидуальной переносимости чрезмерных физических нагрузок, уровня физической утомляемости и психоэмоционального стресса.

Исследование специальной физической и функциональной подготовленности спортсменов. Анализ изменений в характеристиках специальной подготовленности спортсменов, которые произошли в ходе 4-недельного эксперимента, показал, что спортсменам экспериментальной группы удалось значительно увеличить мощность на уровне ПАНО (табл. 6.8): у женщин из этой группы прирост составил 12,6 Вт, а у мужчин 11,3 Вт. В то же время в контрольной группе изменения были значительно меньшими: женщины этой группы снизили мощность на 1,0 Вт, а мужчины – увеличили на 3,3 Вт.

На рис. 6.3 показан пример изменения линий зависимости ЧСС–мощность у одного из спортсменов основной группы. Видно, что данный спортсмен смог выполнить на 40–50 Вт большую

Таблица 6.8

Средние величины мощности на уровне ПАНО до и после проведения эксперимента

Группа	ПАНО до, Вт	ПАНО после, Вт	Различия, Вт	Достоверность различий, <i>p</i>
Осн. жен.	174,4 ± 11,4	187,0 ± 10,6	12,6	0,17
Осн. муж.	290,3 ± 52,0	301,6 ± 49,3	11,3	0,70
Контр. жен.	170,0 ± 20,8	169,0 ± 21,3	–1,0	0,88
Контр. муж.	260,5 ± 51,0	263,7 ± 51,0	3,3	0,89

мощность при тех же значениях ЧСС или, иначе говоря, величины его ЧСС были на 10–12 уд./мин ниже при выполнении нагрузки той же мощности.

На рис. 6.4 показан пример изменения линий зависимости ЧСС–мощность у одной из спортсменок контрольной группы. Видно, что произошло некоторое улучшение специальной работоспособности данной спортсменки при умеренной интенсивности

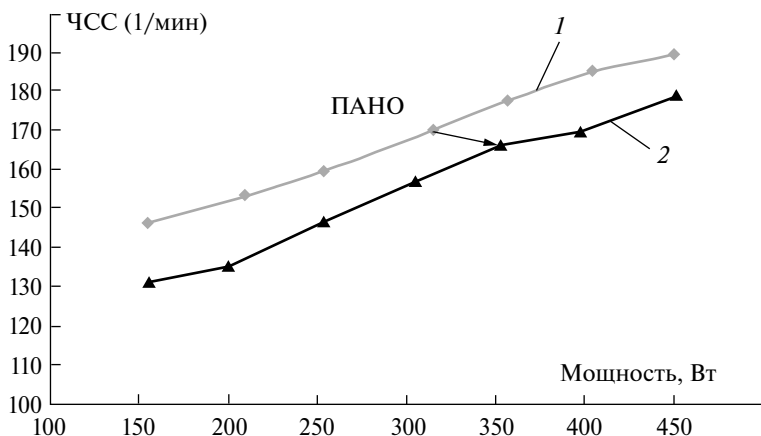


Рис. 6.3. Пример кривых зависимости ЧСС–мощность для одного из спортсменов основной группы: 1 – до эксперимента; 2 – после эксперимента

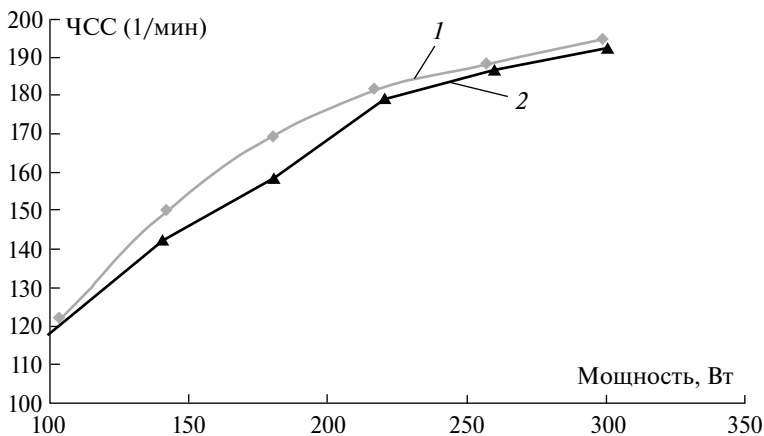


Рис. 6.4. Пример кривых зависимости ЧСС–мощность для одной из спортсменок контрольной группы: 1 – до эксперимента; 2 – после эксперимента

гребли. Однако при мощности гребли, близкой к соревновательной, позитивные сдвиги были очень малы.

При оценке соревновательной работоспособности (смешанная аэробно-анаэробная мощность) в максимальном тесте на гребном эргометре Concept2 на дистанции 2 км было выявлено, что все спортсмены основной группы улучшили свои результаты. Время прохождения соревновательной дистанции снизилось в среднем на 7,6 с у женщин и на 7,3 с у мужчин основной группы. В то же время у женщин контрольной группы результат улучшился лишь на 4,0 с, а у мужчин основной группы практически не было выявлено улучшения результата (табл. 6.9).

Результаты тестов на максимальную силу также показали, что спортсмены основной группы смогли добиться больших сдвигов, которые почти в 2 раза превышали изменения, произошедшие в контрольной группе (табл. 6.10 и 6.11).

Статистический анализ показал, что спортсмены основной группы показали в 2–3 раза больший прирост специальной ра-

Таблица 6.9

Скорость прохождения (2 км) теста на эргометре до и после проведения эксперимента

Группа	T2000 до эксперимента, м/с	T2000 после эксперимента, м/с	Разница, м/с
Осн. жен.	7/05,6 ± 0/07,1	6/58,0 ± 0/07,0	0/07,6
Осн. муж.	6/21,3 ± 0/25,9	6/14,0 ± 0/23,7	0/07,3
Контр. жен.	7/11,7 ± 0/12,0	7/07,7 ± 0/10,9	0/04,0
Контр. муж.	6/23,8 ± 0/13,1	6/23,5 ± 0/14,3	0/00,4

Таблица 6.10

Результаты теста на максимальную силу рук – тяга на доске лежа

Группа	Тяга лежа до эксперимента, кг	Тяга лежа после эксперимента, кг	Разница, кг
Осн. жен.	72,6 ± 1,4	78,0 ± 1,5	5,4
Осн. муж.	98,3 ± 5,6	102,5 ± 5,2	4,2
Контр. жен.	73,5 ± 0,5	74,8 ± 0,4	1,3
Контр. муж.	97,0 ± 4,8	100,3 ± 5,4	3,3

Результаты теста на максимальную силу ног – приседания

Группа	Приседания до эксперимента, кг	$\pm \sigma$, кг	Приседания после эксперимента, кг	$\pm \sigma$, кг	Разница, кг
Осн. жен.	88,3	1,8	94,4	2,0	6,1
Осн. муж.	127,0	7,3	133,3	6,8	6,3
Контр. жен.	91,5	1,3	94,2	0,5	2,7
Контр. муж.	126,1	6,2	130,3	7,0	4,2

ботоспособности, чем спортсмены контрольной группы. Однако различия между основной и контрольной группами не позволяют отвергнуть нулевую гипотезу, что объясняется значительной неоднородностью групп и большой вариацией результатов внутри каждой из групп, а также незначительным временем интервенции, которое не позволило получить более заметные сдвиги в специальной работоспособности.

6.1.3. Влияние перорального применения пептида EDR на физическую и умственную работоспособность спортсменов-борцов разного возраста

В исследовании приняли участие юноши, занимающиеся спортивной борьбой, возраст – $22,5 \pm 4,4$ года. Старшая возрастная группа была сформирована из тренеров по борьбе (возраст – $42,5 \pm 6,8$ лет). Спортивная квалификация – кандидаты в мастера и мастера спорта.

Во время проведения констатирующего эксперимента использовали тест Спилбергера–Ханина для определения уровня личностной тревожности, поскольку известно, что от него зависит чувствительность к внешним неблагоприятным воздействиям (интенсивная физическая нагрузка) и к фармакологическим препаратам, в том числе пептидам.

Остальные показатели определяли дважды – во время констатирующего (до использования пептидного биорегулятора) и формирующего эксперимента (после использования пептидного биорегулятора).

Использовали анкету для экспресс-оценки состояния основных систем организма, в которой перечислены 10 наиболее харак-

терных симптомов для каждой системы, оценивающихся по двум параметрам: частоте проявлений (отсутствуют – 0 баллов, редко – 1 балл, часто – 2 балла, постоянно – 3 балла) и по силе выраженности (слабо – 1 балл, умеренно – 2 балла, сильно – 3 балла).

При анализе результатов количественной оценки частоты проявлений и силы выраженности симптомов в каждом из блоков выводится интегральный коэффициент (сумма баллов по частоте и силе) или показатель болезненности, который является основным индикатором степени неблагополучия и уровня здоровья.

Первые шесть блоков вопросов анкеты позволяют выявить нарушения поведения человека пограничного уровня: астенический, невротический, истероподобный, психостенический, психохарактерологический и цереброастенический синдромы.

Астенический синдром – поведение, характеризующееся повышенной утомляемостью, истощаемостью, ослаблением или утратой способности к продолжительному физическому или умственному напряжению, раздражительностью, частой сменой настроения, слезливостью, капризностью, вегетативными расстройствами. По преобладанию явлений потери самообладания, несдержанности, раздражительности или, наоборот, быстрой истощаемости, раздражительной слабости выделяют гиперстенический и гипостенический синдромы.

Невротический синдром – поведение, характеризующееся субъективными переживаниями (чувство тревоги, собственной неполноценности, страх высоты, замкнутых пространств, навязчивые мысли, воспоминания и др.), соматовегетативными расстройствами (нарушенный сон, плохой аппетит, рвота, диарея, учащенное сердцебиение и т. п.).

Истероподобный синдром – для поведения человека характерны: беспредельный эгоцентризм, ненасытная жажда внимания к своей особе, восхищения, удивления, почитания, сочувствия. Лживость и фантазирование целиком направлены на приукрашивание своей персоны. Кажущаяся эмоциональность в действительности оборачивается отсутствием глубоких искренних чувств при большой экспрессии эмоций, театральности, склонности к рисовке и позерству.

Психостенический синдром – для поведения человека характерны: нерешительность и склонность к рассуждениям, тревожная мнительность и любовь к самоанализу, легкость формирования навязчивых страхов, опасений, действий, ритуалов, мыслей, представлений.

Психохарактерологический синдром — особенности поведения, называемые «плохим характером», реакциями протеста, асоциальным поведением, обусловлены психотравматической ситуацией в детстве и (или) неправильным воспитанием.

Церебрастенический синдром — поведение с симптомами мозгового (церебрального) происхождения (головокружение, психо-сенсорные расстройства и т. д.) связывают с отставанием развития центральной нервной системы (ЦНС) или с ее травмами.

Следующие четыре блока анкеты отражают состояние сердечно-сосудистой системы, системы кроветворения (анемический синдром), иммунной системы (аллергический синдром) и вегетативной нервной системы (синдром вегето-сосудистой дистонии). Синдром вегето-сосудистой дистонии объединяет признаки нарушения регуляции сосудистого русла организма (водного баланса, терморегуляции и т. д.).

Для определения биологического возраста использовали метод Войтенко. Для выявления групп риска развития того или иного заболевания в результате действия неблагоприятных профессиональных факторов используют такое понятие, как биологический возраст (БВ). В традиционном понимании БВ отражает рост, развитие, созревание, старение организма.

Для мужчин формула расчета биологического возраста выглядит следующим образом:

$$БВ = 27,0 + 0,22 \times АДП - 0,15 \times ЗДВ - 0,72 \times СОЗ - 0,15 \times СБ,$$

где АДП — пульсовое давление (разница между систолическим и диастолическим давлением, мм рт. ст.); ЗДВ — продолжительность задержки дыхания после глубокого вдоха, с; СОЗ — индекс самооценки здоровья по анкете; СБ — статическая балансировка (поза Ромберга), с.

Умственную работоспособность, показатели точности внимания определяли в корректурной пробе Анфимова. Физическую работоспособность оценивали с помощью гарвардского степ-теста (ИГСТ). При определении ИГСТ с левой ноги по счету руководителя испытуемый на шагивает на ступеньку высотой около 40 см (обычный стул или табуретка) с частотой 30 восхождений в минуту в течение 4 минут. Сразу после нагрузки сесть на стул и посчитать ЧСС за 2-ю, 3-ю и 4-ю минуты после нагрузки.

$$ИГСТ = \frac{100 \times T}{(ЧСС_2 + ЧСС_3 + ЧСС_4)},$$

где T — время работы в секундах ($4 \text{ минуты} \times 60 = 240 \text{ с}$).

Если ИГСТ 90 и больше – физическая работоспособность отличная; если 80–89 – хорошая; 65–79 – средняя (тренировочную нагрузку можно снизить); если 56–64 – ниже среднего, менее 55 – плохая.

Для оценки интенсивности реакций СРО в слюне испытуемых (рот предварительно ополаскивали физиологическим раствором) определяли активность основного фермента антиоксидантной защиты – СОД, а также высоту быстрой вспышки (Н) и светосумму (Sm) перекись-люминол-зависимой хемилюминесценции.

Результаты обрабатывали в программе Statistica 5.5a. Использовали t-критерий Стьюдента для зависимых и независимых выборок. Достоверно различающимися признавали значения, p которых было меньше 0,05. При $0,05 < p < 0,1$ различия между средними имели тенденцию к достоверности.

Испытуемых каждой возрастной группы разделили на этапе констатирующего эксперимента на следующие подгруппы:

Первая группа (молодые): подгруппа 1а – с низким уровнем личностной тревожности (5 чел., 30–39 баллов); подгруппа 1б – со средним уровнем личностной тревожности (5 чел., 40–45 баллов); подгруппы 1в и 1г – с высоким уровнем личностной тревожности (5 чел., 46 баллов и выше). Вторая группа (тренеры) – тоже была разделена на подгруппы – с низким и средним, а также с высоким уровнем тревожности.

Необходимо отметить, что формирующий эксперимент начали с группы молодых спортсменов (подгруппа с высоким уровнем личностной тревожности) во время предсоревновательного тренировочного периода. В подгруппе 1в использовали максимальную дозировку согласно листку-вкладышу (рекомендации по применению биологически активной добавки к пище «Пинеалон»). Через 3–5 дней после начала приема препарата у всех 5-ти испытуемых в данной подгруппе зарегистрировано значительное увеличение ЧСС и АД во время и после тренировок по сравнению с показателями до использования пептида. Появились жалобы на головную боль, сердцебиение (во время и после тренировок). В связи с описанными изменениями в данной подгруппе пришлось снизить дозировку препарата до 1 капсулы 1 раз в день (утром во время еды, не менее чем за 1 час до начала утренней тренировки). Общая продолжительность приема препарата составила 15 дней (последняя капсула была принята накануне начала соревнований).

В 1а и 1б подгруппах и подгруппе 1г (учитывая вышеописанный опыт) Пинеалон принимали по следующей схеме: первые пять дней – по 1 капсуле утром после еды, следующие пять дней – по 1 капсуле утром и вечером (примерно в 18 часов, не позже чем

за 1 час до начала вечерней тренировки), следующие пять дней — по 1 капсуле утром (дозировка — в одной капсуле 100 мкг). Данная схема применения Пинеалона оказалась более эффективной в подгруппе высокотревожных испытуемых, так как именно у них были зарегистрированы достоверные улучшения показателей умственной и физической работоспособности.

Важным результатом исследования состояния здоровья основных систем организма на этапе констатирующего эксперимента (до использования пептида) является высокий уровень здоровья сердечно-сосудистой, кроветворной, иммунной и периферической нервной системы (меньше или равно 24 балла), тогда как состояние здоровья ЦНС соответствовало среднему уровню и ниже среднего (25—48 баллов) и указывало на наличие нарушений поведения пограничного уровня по типу истероподобного и психохарактерологического синдромов (рис. 6.5, см. на вклейке). Частота встречаемости и выраженность проявления симптомов дезадаптации ЦНС в подгруппе обследованных молодых борцов представлена на рис. 6.6 (см. на вклейке).

Полученные данные хорошо согласуются с тем, что исследованные нами показатели физической и умственной работоспособности после тренировок достоверно снижались у всех испытуемых с высоким уровнем личностной тревожности на 22—25%, что соответствует выраженной степени утомления (табл. 6.12 и 6.13).

Кроме того, после тренировок в слюне отмечено достоверное увеличение интенсивности свободнорадикального окисления (табл. 6.14).

На это указывает повышение светосуммы и высоты быстрой вспышки хемилюминесценции. Светосумма отражает общее число образовавшихся радикалов липидов LO_2 .

Высота быстрой вспышки прямо пропорциональна концентрации гидроперекисей липидов $LOOH$ в пробе (собственно, быстрая вспышка обусловлена разложением присутствующих в пробе перекисей).

Одновременно зарегистрировано резкое увеличение активности супероксиддисмутазы в слюне (см. табл. 6.14), что является плохим прогностическим признаком, поскольку известно, что СОД имеет внутриклеточную локализацию и выход ее в слюну или плазму крови свидетельствует о разрушении мембранных структур клеток крови и тканей (известно, что деструктивному повреждению наиболее подвержены мембраны эритроцитов, и это ухудшает кислородтранспортные функции крови).

Показатели биологического возраста (особенно продолжительность статической балансировки) также свидетельствовали

**Влияние Пинеалона на показатели умственной и физической работоспособности
в подгруппе молодых высокотренированных борцов**

Исследование	P	A	V	Q	ИГСТ
До использования Пинеалона					
До тренировки	1069,1 ± 21,1	0,847 ± 0,02	4,11 ± 0,38	485,75 ± 32,6	90,2 ± 0,94
После тренировки	833,9 ± 16,5 -22% $p_1 < 0,05$	0,652 ± 0,03 -23% $p_1 < 0,05$	3,78 ± 0,62 -8% $p_1 > 0,1$	437,1 ± 40,4 -10% $p_1 > 0,1$	67,7 ± 1,16 -25% $p_1 < 0,05$
После приема Пинеалона					
До тренировки	1229,5 ± 16,9 + 15% $p_2 > 0,1$	0,999 ± 0,02 + 17% $0,05 < p_2 < 0,1$	4,85 ± 0,46 + 18% $0,05 < p_2 < 0,1$	553,70 ± 48,3 + 14% $p_2 > 0,1$	100,1 ± 1,03 + 11% $0,1 < p_2 < 0,05$
После тренировки	1180,3 ± 32,4 -4% $p_1 > 0,1$	0,959 ± 0,01 -14% $0,05 < p_1 < 0,1$	4,51 ± 0,85 -7% $p_1 > 0,1$	526,02 ± 30,7 -5% $p_1 > 0,1$	98,8 ± 1,2 -2%, $p_1 > 0,1$ + 46% $p_2 < 0,05$

Примечание: М + т, n = 5–10; P – коэффициент умственной продуктивности; А – точность внимания; V – скорость переработки зрительной информации; Q – объем переработанной зрительной информации; p_1 – достоверность отличий по отношению к показателям до тренировки, p_2 – по отношению к показателям до пептида.

Зависимость степени утомления и показателей психометрического тестирования

Утомляемость	Изменение функций к концу рабочего дня, %					
	СМУ	КП	ПЗМР	СЗМР	ВН	КЧСМ
I степень (мало выражена)	До 5	До 5	До 3	До 3	До 5	До 2
II степень (умеренная)	6–20	6–20	4–15	4–15	6–20	3–8
III степень (выраженная)	21–35	21–35	16–30	16–30	21–40	9–15
IV степень (очень выраженная)	36 и более	36 и более	31 и более	31 и более	41 и более	16 и более

Примечание: утомление различают по степени выраженности, которую оценивают по следующим показателям:

- мышечной выносливости (СМУ);
- объему кратковременной памяти (КП);
- латентному периоду простой (ПЗМР) и сложной (СЗМР) зрительно-моторных реакций;
- показателю переключения внимания (ВН);
- критической частоте слияния световых мельканий – КЧСМ.

**Влияние Пинеалона на интенсивность свободнорадикального окисления
и активность ферментов антиоксидантной защиты при физической нагрузке
у молодых высококровожадных борцов**

Исследование	H ₂ O ₂ -люминол-зависимая ХЛ		СОД, ед. активности на 1 мл слюны
	H, мм на ленте самописца	Sm, усл. ед. ХЛ за 100 с	
До приема Пинеалона			
До тренировки	95,6 ± 0,48	245,5 ± 36,1	2,60 ± 0,03
После тренировки	117,9 ± 0,12 + 23% <i>p</i> ₁ < 0,05	309,3 ± 18,2 + 26% <i>p</i> ₁ < 0,05	4,88 ± 0,04 + 88% <i>p</i> ₁ < 0,05
После приема Пинеалона			
До тренировки	88,4 ± 1,25 -8% <i>p</i> ₂ > 0,1	212,6 ± 9,34 -13% 0,05 < <i>p</i> ₂ < 0,1	2,03 ± 0,05 -22% <i>p</i> ₂ < 0,05
После тренировки	102,5 ± 0,74 + 16% 0,05 < <i>p</i> ₁ < 0,1 -13% 0,05 < <i>p</i> ₂ < 0,1	226,9 ± 2,85 + 7%, <i>p</i> ₁ > 0,1 -27%, <i>p</i> ₂ < 0,05	2,68 ± 0,02 + 32%, <i>p</i> ₁ < 0,05 -45%, <i>p</i> ₂ < 0,05

Примечание: M + m, n = 5–10; *p*₁ – достоверность отличий по отношению к показателям до тренировки, *p*₂ – по отношению к показателям до пептида.

о возможности отнесения изученного контингента спортсменов в группу риска развития серьезных нарушений функционирования ЦНС (табл. 6.15) в результате действия неблагоприятных профессиональных факторов (переутомление, травмы и ушибы головы).

Во второй части эксперимента все испытуемые использовали пептидный биорегулятор головного мозга Пинеалон (биологически активная добавка к пище, состоящая из трипептида, в состав которого входят аминокислоты аргинин, глутаминовая и аспарагиновая кислоты, известные как стимуляторы работоспособности и участвующие в образовании АТФ в цикле Кребса).

На фоне использования пептида увеличились показатели физической (на 45%) и умственной работоспособности (на 15–22%) по сравнению с результатами без использования пептида. Степень утомления после тренировки уменьшилась, улучшилось состояние основных систем организма (ССС, центральной нервной и вегета-

**Влияние Пинеалона на показатели биологического возраста
и скорость старения спортсменов-борцов**

Показатель	До использования Пинеалона	После использования Пинеалона
СБ	17,4 ± 0,81	25,8 ± 1,02 + 48% <i>p</i> < 0,05
ЗДВ	65,3 ± 2,39	82,9 ± 3,67 + 27% <i>p</i> < 0,05
БВ	24,2 ± 0,5	21,6 ± 0,7
КВ	22,5 ± 1,4	22,5 ± 1,4
БВ-КВ	+1,7	-0,95

Примечание: М + т, n = 5–10; *p* – достоверность отличий по отношению к показателям до пептида.

тивной системы, системы иммунитета) и показатели биологического возраста (табл. 6.13 и 6.15, см. рис. 6.5 на вклейке).

К механизму описанного действия использованного пептидного препарата можно отнести его антиоксидантный и мембраностабилизирующий эффект, зарегистрированный в нашем эксперименте (табл. 6.14). На мембраностабилизирующий эффект Пинеалона указывает снижение активности внеклеточной СОД в слюне обследованных спортсменов, а на его антиоксидантное действие – уменьшение образования липидных радикалов и гидроперекисей липидов, что особенно заметно в пробах слюны, взятых после тренировки.

Описанные изменения имели ту же тенденцию и в старшей возрастной группе, а для некоторых показателей (особенно для показателей биологического возраста) даже были более выражены.

Таким образом, полученные данные позволяют считать использование Пинеалона перспективным в качестве стимулятора работоспособности, профилактики и коррекции утомления и нарушения деятельности центральной нервной системы и основных систем организма при интенсивных физических нагрузках у спортсменов-борцов, а также в качестве препаратов, улучшающих показатели биологического возраста.

6.2. Эффективность перорального применения пептидов EDR и KED для коррекции психоэмоционального состояния у мужчин пожилого возраста

Современная демографическая ситуация в мире и нашей стране характеризуется глобальным старением населения (увеличением в популяции доли лиц пожилого и старческого возраста). Психологические особенности лиц пожилого возраста (60–74 года) характеризуются изменениями в эмоциональной, когнитивной и мотивационной сферах личности, а также, зачастую, развитием психической патологии, снижением умственной активности и изменением социальных установок. Данный факт способствует разнообразным нарушениям психоэмоциональной сферы у лиц, относящихся к данной возрастной группе, и обуславливает необходимость ее коррекции.

Психоэмоциональные нарушения способствуют снижению функционального состояния и качества жизни людей, а в ряде случаев приводят к возникновению нервно-психической патологии. Это определяет высокую социальную значимость и необходимость постоянного совершенствования средств и способов профилактики и коррекции психоэмоциональных нарушений у лиц пожилого возраста, особенно мужчин старших возрастных групп.

Одним из эффективных способов сохранения соматического и психического здоровья, а также профилактики преждевременного угасания функций организма является применение пептидных биорегуляторов, в том числе нейропротекторного пептида EDR и вазопротекторного пептида KED.

Цель исследования – оценка эффективности применения пептидных биорегуляторов Пинеалона (активное вещество – пептид EDR) и Везугена (активное вещество – пептид KED) для коррекции психоэмоциональных нарушений у мужчин пожилого возраста.

Решение поставленных в работе задач осуществлялось путем проведения комплексного исследования психоэмоционального состояния, функционального состояния ЦНС и функций памяти у 170 мужчин в возрасте 60–74 года (средний возраст $68,3 \pm 0,3$ лет). Критерием исключения являлось наличие у обследуемых избыточного веса, никотиновой и/или алкогольной зависимости, а также заболеваний мозга и ЦНС. Мужчины были разделены на четыре группы (три основных и одну контрольную) методом блоковой рандомизации. Первый этап исследования был ориентирован на разработку методики оценки эффективности применения пептидных биорегуляторов. Второй этап исследования был посвящен

оценке эффективности применения синтетических пептидных биорегуляторов Пинеалона и Везугена отдельно и в комплексе. Третий этап исследования был посвящен оценке длительности воздействия пептидных биорегуляторов. Для этого были проанализированы результаты исследования через 6 месяцев после начала курса применения биорегуляторов.

Первую основную группу (ОГ-1) составили 43 человека (средний возраст $67,8 \pm 0,5$ лет), применявших пептидный биорегулятор Пинеалон перорально по 1 капсуле 2 раза в день ежедневно в течение 30 дней. Во вторую основную группу (ОГ-2) вошли 45 человек (средний возраст $68,1 \pm 0,6$ лет), которые получали пептидный биорегулятор Везуген по 1 капсуле 2 раза в день в течение 30 дней. В третью основную группу (ОГ-3) вошли 42 человека (средний возраст $69,1 \pm 0,9$ лет), которые получали пептидные биорегуляторы Пинеалон и Везуген по 1 капсуле каждого препарата 2 раза в день в течение 30 дней. Четвертая – контрольная группа (КГ) состояла из 40 человек (средний возраст $70,0 \pm 0,2$ лет), которые получали в качестве плацебо поливитамины Декамевит производства компании «АЙ СИ ЭН Октябрь», предназначенные для лиц пожилого возраста.

При клиническом изучении установлена эффективность Пинеалона в комплексном лечении пациентов с нарушением функции головного мозга, в том числе после черепно-мозговой травмы, инсульта, оперативных вмешательств на головном мозге, воздействии на организм экстремальных психоэмоциональных факторов, а также для поддержания умственной работоспособности лиц пожилого и старческого возраста. Пинеалон способствует улучшению интеллектуальных функций головного мозга (памяти, внимания и т.д.) у лиц, чья профессиональная деятельность требует повышенной концентрации внимания.

При клиническом изучении установлена эффективность Везугена в комплексном лечении пациентов, страдающих атеросклерозом сосудов сердца, головного мозга и нижних конечностей, нарушением микроциркуляции в различных органах и тканях, при психоэмоциональном стрессе, а также для профилактики заболеваний сосудов у людей пожилого и старческого возраста.

Для сравнительной оценки в указанных группах исследовали динамику характеристик психоэмоционального статуса посредством интегральных показателей эффективности пептидной биорегуляции, а также показатели психоэмоционального состояния (ПЭС), нейрофизиологические характеристики ЦНС и функций памяти. Для контроля эффективности коррекции психоэмоционального состояния обследуемых был использован методический

подход, обоснованный Ю.В. Лобзиным. На его основе нами был использован перечень интегральных признаков, позволяющих количественно оценить индекс тяжести ПЭС и индекс восстановления ПЭС.

Комплекс данных признаков был получен экспертным путем (на основе анализа медицинской литературы, историй болезни и медицинских карт, сбора анамнеза и клинико-физиологических и психологических показателей у лиц пожилого возраста). В качестве экспертов выступали врачи-гериатры, имеющие опыт лечения лиц пожилого возраста, которые оценили значимость 45 различных клинико-физиологических признаков психоэмоционального состояния. Сбор этих данных проводился с помощью специальной анкеты, включавшей исходный перечень признаков.

Был определен комплекс из 17 наиболее информативных клинико-физиологических признаков для оценки степени нарушения психоэмоционального состояния. Эти признаки с учетом их ранговой значимости были использованы для вычисления эффективности коррекции состояния мужчин пожилого возраста по алгоритму, который позволяет оценивать такие показатели, как индекс тяжести состояния и индекс восстановления ПЭС. С помощью этих показателей был проведен количественный анализ эффективности применения пептидных биорегуляторов у мужчин пожилого возраста.

Эффективность пептидной коррекции также оценивалась посредством комплекса показателей, включавших традиционные методы контроля — оценка психоэмоционального, нейрофизиологического и мнестического статуса.

Оценку психоэмоционального статуса осуществляли на основе клинико-физиологических показателей с помощью психофизиологических тестов: «методика диагностики оценки самочувствия, активности и настроения» (САН), «методика Спилбергера–Ханина», «методика Люшера», а также двух тестов на выявление уровня депрессии: «шкала Цунга» и «госпитальная шкала тревоги и депрессии».

Тест «САН» — тест дифференциальной самооценки функционального состояния — предназначен для оценки актуального (текущего) функционального состояния. Тест разработан на основе принципа семантического дифференциала и позволяет оценить функциональное состояние по трем составляющим: самочувствие, активность, настроение. В зависимости от субъективной оценки своего состояния обследуемый отмечал степень выраженности того или иного признака по стабильной шкале от -3 до $+3$.

Методика «шкала реактивной и личностной тревожности Спилбергера–Ханина» предназначена для оценки тревоги как реактивного состояния и тревожности как свойства личности временного, преходящего состояния и относительно постоянного. В работе использован сокращенный вариант теста, позволивший оценивать реактивную (ситуационную) тревожность обследуемых со шкалой оценки от 0 до 20 баллов. Цветовой тест М. Люшера был использован в модифицированном варианте в виде методики «цветовая психодиагностика» (ЦПД). Стимульный материал методики ЦПД состоит из 28 цветных квадратов (30 × 30 мм), размещенных попарно на карточки белого цвета (60 × 90 мм). Всего в цветной методике использовались 8 цветовых тонов, идентичных цветам методики М. Люшера. «Шкала Цунга» представляет собой опросник, в котором учитываются 20 факторов, определяющих четыре уровня депрессии. В тесте присутствуют десять позитивно сформулированных и десять негативно сформулированных вопросов. Каждый вопрос оценивается по шкале от 1 до 4.

Нейрофизиологические характеристики ЦНС исследовались при помощи тестов «диагностика функционального состояния ЦНС» и «реакция на движущиеся объекты» (РДО). Методика «диагностика функционального состояния ЦНС» представляет собой сенсомоторную реакцию в виде 50 предъявлений светового сигнала. Тест валидизирован на больших выборках, в том числе путем сопоставления с количественными электроэнцефалографическими (ЭЭГ) характеристиками. При обработке результатов были определены: среднее время реакции, модальное время реакции, максимальная частота, устойчивость реакций, уровень функциональных возможностей и функциональное состояние ЦНС.

Методика РДО предназначена для исследования и оценки процессов возбуждения и торможения и их уравновешенности в коре головного мозга, точности в оценке параметров движущегося объекта и отражает восприятие человеком пространственно-временных отношений. Сущность методики заключается в необходимости остановить стрелку прибора (курсор), движущуюся с определенной скоростью, на заданном делении шкалы. Зачет проводился по 25 реакциям обследуемых.

Функции памяти были обследованы при помощи трех методик, предназначенных для диагностики мнестических и гностических функций человека. Проводились следующие тесты: «кратковременная зрительная память на числа», «оперативная память» и «долговременная память». «Кратковременная зрительная память на числа» представляет собой методику, в которой участнику предлагается таблица случайных чисел. Через 20 секунд таблица уби-

рается, и обследуемого просят записать все те числа, которые он запомнил. Оценка кратковременной зрительной памяти проводится по количеству правильно воспроизведенных чисел. Методика удобна для группового тестирования, так как процедура не занимает много времени.

Методика «оперативная память» используется для определения способности удерживать в оперативной памяти значительный объем информации и осуществлять с ней необходимые манипуляции, а также выносливости к интеллектуальной нагрузке и продолжительности сосредоточения. 10 раз испытуемому называют пять чисел. Задача — постараться запомнить их, затем в уме сложить первое число со вторым, а полученную сумму записать; второе число сложить с третьим, сумму записать, и четвертое с пятым, снова записать сумму. Время для вычислений одной группы цифр — 15 секунд. Далее подсчитывается число правильно найденных сумм.

Методика «долговременная память» оценивает скорость воспроизведения информации, содержащейся в долговременной памяти. Испытуемому последовательно предъявляются 10 вопросов из разных областей знаний. Необходимо как можно быстрее дать инструктору правильные ответы. На каждый вопрос отводится по 40 секунд. Оценка результатов проводится на основании количества правильных ответов. Абсолютные значения переводятся в балльные оценки.

Статистическую обработку результатов исследования проводили с использованием стандартных программ для персональных компьютеров. Также использовались непараметрические методы обработки данных.

Первый этап исследования был посвящен разработке и обоснованию методики контроля степени тяжести и эффективности коррекции психоэмоционального состояния мужчин пожилого возраста. Для разработки указанной методики использовали методические принципы и научно-практические рекомендации по контролю реабилитации пациентов. Второй этап исследования был посвящен сравнительной оценке эффективности применения трех различных способов коррекции психоэмоциональных нарушений у мужчин пожилого возраста — пептидного биорегулятора функций мозга Пинеалона (ОГ-1), пептидного биорегулятора сосудов Везугена (ОГ-2), а также применения пептидных биорегуляторов Пинеалона и Везугена в комплексе (ОГ-3). Четвертая группа, применявшая поливитамины, была контрольной (КГ). Динамика изменения признаков тяжести психоэмоционального состояния и восстановления представлена в табл. 6.16.

Индекс тяжести состояния у лиц пожилого возраста, использовавших пептидные биорегуляторы по отдельности (ОГ-1 и ОГ-2), показывает менее значимые улучшения по сравнению с ОГ-3, где использовались биорегуляторы в комплексе. Так, например, индекс тяжести состояния у мужчин группы ОГ-3 после коррекции снизился на 42,5%, в то время как у мужчин группы ОГ-1 на 12,8%, а у лиц группы ОГ-2 – всего на 3,5% (в контрольной группе – на 1,8%). Индекс восстановления продемонстрировал такую же закономерность. После коррекции у мужчин пожилого возраста ОГ-3 показатель индекса тяжести состояния был достоверно меньше не только по отношению к показателю у лиц контрольной группы ($46,20 \pm 3,44$ балла против $80,25 \pm 3,40$ балла), но и был достоверно ниже показателей у лиц ОГ-2 ($79,42 \pm 4,23$ балла). Такая же тенденция наблюдается при изучении показателя индекса восстановления.

Результаты исследования психоэмоционального состояния у мужчин пожилого возраста по данным тестов САН, шкалы тревожности Спилберга–Ханина и цветовой методики Люшера показали, что изменения психоэмоционального состояния у лиц пожилого возраста в 3 основных группах носили позитивный характер. Однако наиболее выраженные позитивные изменения психоэмоционального состояния отмечены у мужчин ОГ-3, где применялись пептидные биорегуляторы в комплексе.

Так, у пожилых мужчин ОГ-3 в результате коррекции психоэмоциональных нарушений с помощью комплекса пептидных биорегуляторов отмечено улучшение 71,4% показателей тестов, тогда как в ОГ-1, ОГ-2 и КГ эти показатели составили 57,1%, 44,4%, 7,1% соответственно.

Важно отметить, что после коррекции у мужчин пожилого возраста ОГ-3 показатель теста Спилберга–Ханина «реактивная тревожность» был достоверно меньше не только соответствующего показателя у лиц контрольной группы ($8,7 \pm 1,3$ балла против $18,4 \pm 2,3$ балла, $p < 0,05$), но и был достоверно ниже показателей у лиц ОГ-1 и ОГ-2 ($11,8 \pm 1,3$ балла и $13,4 \pm 1,4$ балла соответственно, $p < 0,05$). Аналогичная тенденция прослеживается при анализе показателей цветовой методики Люшера: показатели «суммарное отклонение» и «работоспособность» у лиц пожилого возраста ОГ-3 была достоверно выше соответствующих показателей у лиц как контрольной группы, так и групп ОГ-1 и ОГ-2. Обращает на себя внимание существенное улучшение показателей, характеризующих уровень тревоги и депрессии по шкалам Цунга и «госпитальной шкале тревоги и депрессии», у пожилых мужчин, принимавших комплекс Пинеалона и Везугена (группа ОГ-3). Так, у мужчин ОГ-3

Таблица 6.16

**Интегральные показатели восстановления психоэмоционального статуса
у пожилых мужчин различных групп (в баллах)**

Показатель	КГ (Декамевит)		ОГ-1 (Пинеалон)		ОГ-2 (Везуген)		ОГ-3 (Комплексе)	
	Исходное состояние	После коррекции	Исходное состояние	После коррекции	Исходное состояние	После коррекции	Исходное состояние	После коррекции
Индекс тяжести состояния	81,76 ± 2,75	80,25 ± 3,40	80,64 ± 5,32	69,45*# ± 3,16	82,31 ± 3,47	79,42 ± 4,23	80,35 ± 4,06	46,20*#^ ± 3,44
Индекс восстановления	19,45 ± 3,16	20,81 ± 2,21	19,65 ± 3,45	39,11*# ± 2,19	18,02 ± 3,42	24,42 ± 5,31	19,12 ± 2,05	56,14*#^ ± 3,43

Примечание: * – $p < 0,05$ по сравнению с исходным показателем в данной группе; # – $p < 0,05$ по сравнению с соответствующим показателем в контрольной группе и в ОГ-2 (*).

показатели выраженности тяжести депрессии ($1,4 \pm 0,2$ балла), уровня депрессии ($1,1 \pm 0,2$ балла) и уровня тревоги ($1,6 \pm 0,5$ балла) были достоверно меньше, чем показатели исходного состояния ($3,2 \pm 0,4$, $3,1 \pm 0,6$ и $3,7 \pm 0,3$ соответственно).

Таким образом, показатели психоэмоционального состояния у лиц пожилого возраста достоверно улучшаются при коррекции с применением Пинеалона и Везугена по отдельности. Однако наиболее выраженные позитивные изменения показателей отмечаются при комплексном применении обоих пептидных геропротекторов.

Результаты оценки функционального состояния ЦНС по данным тестов РДО и «диагностика функционального состояния ЦНС» у мужчин пожилого возраста 3 основных и контрольной групп до проведения коррекции свидетельствовали о наличии устойчивых неблагоприятных нейрофизиологических паттернов в виде функционального превалирования тормозного процесса над возбуждательным и снижения функциональных возможностей ЦНС.

После проведения коррекции в 3 основных группах отмечено улучшение нейрофизиологических характеристик, но наиболее выраженные изменения отмечены в ОГ-3 (62,5% достоверно улучшившихся показателей), ОГ-2 (37,5% достоверно улучшившихся показателей) и ОГ-1 (50% достоверно улучшившихся показателей), тогда как в контрольной группе число достоверно улучшившихся показателей составило только 1,1% (табл. 6.17). Наиболее выраженные позитивные изменения нейрофизиологических параметров ЦНС отмечены при одновременном использовании Пинеалона и Везугена.

Так, количество точных реакций в тесте РДО у лиц ОГ-3 после коррекции было достоверно больше, чем у лиц КГ и ОГ-2 ($3,9 \pm 0,44$ балла, $1,9 \pm 0,5$ балла и $2,1 \pm 0,54$ балла соответственно, $p < 0,05$). Количество запаздывающих реакций у лиц ОГ-3 было $14,1 \pm 0,8$ балла, что достоверно меньше показателей у лиц контрольной группы ($16,4 \pm 0,85$ балла), ОГ-1 ($14,5 \pm 0,75$ балла) и ОГ-2 ($15,1 \pm 0,61$ балла); $p < 0,05$ для трех сравниваемых показателей. Среднее арифметическое отклонение у лиц ОГ-3 достоверно меньше по сравнению с соответствующими показателями у лиц КГ и ОГ-2 ($7,3 \pm 0,91$ балла против $11,4 \pm 0,75$ балла и $10,9 \pm 0,76$ балла соответственно, $p < 0,05$). Таким образом, комплексное применение Везугена и Пинеалона наиболее эффективно корректирует нейрофизиологические показатели ЦНС.

Таблица 6.17

**Показатели нейрофизиологических функций у мужчин пожилого возраста
до и после коррекции (в баллах)**

Показатель	КГ (Декамевит)		ОГ-1 (Пинеалон)		ОГ-2 (Везуген)		ОГ-3 (Комплекс)	
	Исход. сост.	После коррек- ции	Исход. сост.	После коррек- ции	Исход. сост.	После коррек- ции	Исход. сост.	После коррек- ции
<i>Реакция на движущиеся объекты (РДО)</i>								
Кол-во точных реакций	1,8 ± 0,5	1,9 ± 0,5	1,6 ± 0,57	3,5* ± 0,54	1,9 ± 0,3	2,1 ± 0,54	1,7 ± 0,59	3,9*#° ± 0,44
Кол-во преждевре- менных реакций	7,2 ± 0,52	7,8 ± 0,44	7,2 ± 0,6	7,1 ± 0,61	7,2 ± 0,47	6,1# ± 0,49	7,2 ± 0,41	6,1# ± 0,53
Кол-во запаздываю- щих реакций	18,0 ± 0,74	17,4 ± 0,65	18,0 ± 0,71	14,5*# ± 0,75	18,0 ± 0,69	15,1* ± 0,61	18,0 ± 0,76	11,1*#° ^ ± 0,8
Среднее арифмети- ческое отклонение	10,4 ± 0,91	11,4 ± 0,75	10,4 ± 0,80	7,3*# ± 0,64	10,4 ± 0,87	10,9 ± 0,76	10,4 ± 0,82	7,3*#° ± 0,91
<i>Диагностика функционального состояния ЦНС</i>								
Модальное время реакции	500,0 ± 41,5	505,6 ± 28,6	500,0 ± 35,5	526,5 ± 40,6	500,0 ± 47,1	510,0 ± 40,6	500,0 ± 43,63	535,5 ± 30,61
Устойчивость реакций	-1,7 ± 0,91	-1,6 ± 0,84	-1,7 ± 0,79	-0,5 ± 0,94	-1,75 ± 0,78	-1,7 ± 0,65	-1,7 ± 0,92	-0,5 ± 0,71
Максималь- ная частота	7,7 ± 1,3	8,3 ± 0,90	7,7 ± 1,1	10,5* ± 0,95	7,7 ± 1,0	9,8* ± 0,7	7,7 ± 0,91	11,4*# ± 0,9
Функцио- нальное состояние ЦНС	1,2 ± 0,3	1,3 ± 0,2	1,2 ± 0,3	1,9 ± 0,5	1,2 ± 0,3	1,9*# ± 0,2	1,2 ± 0,2	2*# ± 0,2

Примечание: * – $p < 0,05$ по сравнению с исходным показателем в данной группе;
– $p < 0,05$ по сравнению с соответствующим показателем в контрольной группе;
° – $p < 0,05$ по сравнению с соответствующим показателем в ОГ-1; ^ – $p < 0,05$ по сравнению с соответствующим показателем в ОГ-2.

Результаты исследования мнестических и гностических функций у лиц пожилого возраста посредством тестов «кратковременная зрительная память на числа», «оперативная память» и «долговременная память» выявили положительные изменения функций памяти в 3 основных группах. Наиболее выраженные изменения отмечены у испытуемых ОГ-3.

Так, после коррекции пептидными биорегуляторами кратковременная зрительная память достоверно улучшилась у лиц ОГ-1 и ОГ-3 по сравнению с показателями в контрольной группе ($3,5 \pm 0,2$ балла, $3,7 \pm 0,3$ балла, $2,0 \pm 0,7$ балла соответственно, $p < 0,05$). Однако показатель у пожилых мужчин группы ОГ-3 был достоверно выше и по сравнению с показателем у лиц ОГ-2 ($2,8 \pm 0,5$ балла, $p < 0,05$). Аналогичная тенденция отмечалась и по показателям оперативной памяти и долговременной памяти: у пожилых лиц, получавших комплекс пептидных биорегуляторов, показатели достоверно отличались от соответствующих показателей у лиц как контрольной группы, так и основных групп ОГ-1 и ОГ-2 (табл. 6.18).

Результаты сравнительного анализа данных (рис. 6.7, см. на вклейке), полученных при применении 3 различных схем применения биорегуляторов лицами пожилого возраста, показали, что одновременное применение пептидных биорегуляторов Пинеалона и Везугена привело к улучшению психоэмоционального статуса и психофизиологических показателей. Во всех трех основных группах показатели индекса тяжести психоэмоционального состояния,

Таблица 6.18

Показатели мнестических и гностических функций у мужчин пожилого возраста до и после коррекции (в баллах)

Показатель	КГ (Декамевит)		ОГ-1 (Пинеалон)		ОГ-2 (Везуген)		ОГ-3 (Комплекс)	
	Исход. сост.	После корр.	Исход. сост.	После корр.	Исход. сост.	После корр.	Исход. сост.	После корр.
Кратковременная зрительная память на числа	2,1 $\pm 0,3$	2,0 $\pm 0,7$	1,9 $\pm 0,5$	3,5*# $\pm 0,2$	1,9 $\pm 0,4$	2,8 $\pm 1,2$	1,9 $\pm 0,1$	3,7*# $\pm 0,3$
Оперативная память	9,1 $\pm 1,7$	12,4 $\pm 1,8$	9,8 $\pm 1,3$	17,4*# $\pm 0,9$	9,4 $\pm 1,5$	17,8*# $\pm 1,3$	8,4 $\pm 1,6$	17,5*# $\pm 0,5$
Долговременная память	14,4 $\pm 1,4$	15,5 $\pm 1,9$	15,4 $\pm 1,3$	18,1* $\pm 1,3$	16,4 $\pm 0,8$	17,0 $\pm 1,4$	12,4 $\pm 1,3$	21,6*# $\pm 1,7$

Примечание: Пояснения см. в табл. 6.17.

индекса восстановления психоэмоциональных нарушений, психоэмоционального состояния и нейрофизиологического состояния ЦНС достоверно выше в сравнении с соответствующими показателями в контрольной группе.

С целью многомерной и комплексной оценки динамики психоэмоционального статуса под влиянием пептидной коррекции использовался факторный анализ, который позволил выявить некоторые механизмы воздействия вышеуказанной коррекции. Основная задача факторного анализа состоит в сведении обширного числа исходных признаков к нескольким независимым базовым гипотетическим переменным (факторам), которые манифестируют скрытую, неявную структуру изучаемого явления. В процессе анализа пространство исходных признаков было сужено до 3 фундаментальных внутренних (скрытых) факторов, определяющих значения наблюдаемых признаков, характеризующих психоэмоциональный статус лиц пожилого возраста до и после применения пептидных биорегуляторов. По результатам факторного анализа было выявлено, что динамика факторной структуры психоэмоционального статуса мужчин пожилого возраста до и после коррекции является отражением позитивного эффекта применения пептидных биорегуляторов.

Заключительный этап исследования был посвящен оценке длительности воздействия пептидных биорегуляторов Пинеалона и Везугена. По истечении 5 месяцев с момента окончания первого курса приема препаратов была произведена оценка психоэмоционального состояния тех же групп мужчин пожилого возраста с использованием тех же методик. Мониторинг показал, что по истечении 5 месяцев достоверно высокими показателями психоэмоционального состояния отличались только лица пожилого возраста ОГ-3. Полученные результаты приведены на рис. 6.8 (см. на вклейке).

Результаты отдаленного исследования показали, что применение пептидных биорегуляторов Пинеалона и Везугена в комплексе является эффективным способом восстановления и поддержания психоэмоционального состояния у мужчин пожилого возраста в течение 5 месяцев с момента окончания курса приема биорегуляторов. Данные указывают на необходимость проведения повторных курсов коррекции пептидными биорегуляторами через 5–6 месяцев после первоначального приема. Применение комплекса из 2 биорегуляторов обеспечило более выраженное (в сравнении с 1-й и 2-й основной группой) положительное влияние на психоэмоциональное состояние мужчин пожилого возраста.

Заключение

В настоящее время достижения профессиональных спортсменов поднимают престиж страны на мировой арене, способствуют объединению общества, а также пропагандируют здоровый образ жизни среди населения. На формирование, развитие и проявление таких качеств, как телосложение, сила, быстрота, выносливость, пластичность нервной системы и т. д., влияют генетические и эпигенетические факторы. Благодаря достижениям молекулярной генетики тренер может узнать о генетических особенностях потенциального спортсмена и использовать эту информацию для отбора кандидатов в профессиональный спорт, корректировки тренировок, а также для предупреждения отрицательных последствий для здоровья от спортивной подготовки.

В проведенном исследовании по изучению влияния пептида EDR в комплексе с короткими пептидами на резервные возможности у спортсменок по художественной гимнастике, борцов и у гребцов было установлено, что на фоне применения пептидных биорегуляторов, в том числе пептида EDR, происходила оптимизация функций иммунной системы, показателей сердечно-сосудистой и антиоксидантной систем, увеличение длины теломера. Кроме того, важным результатом является повышение экспрессии стресс-протекторного гена белка теплового шока HSPA1A.

Известно, что у спортсменов часто наблюдается ускоренное старение организма, в том числе и ЦНС. Эффективность пептида EDR показана не только при повышенных физических нагрузках в спорте, но и при естественном старении организма. Установлено, что пептид EDR в сочетании с пептидом KED оказывал выраженное нейропротекторное действие у людей пожилого возраста. Исходно у мужчин пожилого возраста были выявлены различные психоэмоциональные нарушения, среди которых доминировали ухудшение внимания, апатия, депрессивные состояния, снижение психомоторной реакции и потеря памяти. Применение пептидных биорегуляторов (активные вещества пептиды EDR и KED) у мужчин пожилого возраста привело к достоверному улучшению психоэмоционального состояния, нейрофизиологического состояния ЦНС и функций памяти. Наибольшая эффективность была установлена при комплексном применении двух биорегуляторов в течение 5 месяцев после курса приема биорегуляторов.

Таким образом, результаты исследований свидетельствуют о перспективности широкого внедрения пептидных биорегуляторов, в том числе пептида EDR, в практику спортивной медицины, геронтологии и гериатрии, а полифункциональность и участие

в пептидном континууме позволит заменить одним-двумя пептидными препаратами большое количество традиционно применяемых средств и получить длительный эффект за счет пролонгированного действия пептидов.

Литература

1. Арутюнян А.В., Дубинина Е.Е., Зыбина Н.Н. Методы оценки свободно-радикального окисления и антиоксидантной системы организма. СПб.: Фолиант, 2000. 104 с.
2. Афанасьева И.А. Неспецифические показатели иммунной защиты при перенапряжении у спортсменов // Человек, спорт, здоровье. 2007. С. 14–15.
3. Бабаев М.А., Лысенко А.В., Ивко О.М. и др. Особенности профессиональной спортивной деятельности и риск развития ускоренного старения // Успехи геронтологии. 2010. Т. 23, № 4. С. 652–656.
4. Балашова С.Н., Жернаков Г.Л., Дудков А.В. Применение пептидных биорегуляторов у лиц пожилого возраста с нарушениями психоэмоционального состояния // Успехи геронтологии. 2008. Т. 21, № 3. С. 448–452.
5. Ивко О.М., Трофимова С.В. Спорт и долголетие. СПб.: Falcon Crest, 2008. 116 с.
6. Лысенко А.В., Шейхова Р.Г., Руденко Т.Н. и др. Возрастные особенности влияния физической нагрузки на развитие адаптационных реакций крыс с высоким уровнем тревожности // Известия вузов. Северо-Кавказский регион. Естественные науки. Приложение. 2005. № 7. С. 30–39.
7. Михельсон В.М., Гамалей И.А. Укорочение теломер – основной механизм естественного и лучевого старения // Радиационная биология. Радиэкология. 2010. Т. 50, № 3. С. 269–275.
8. Попов А.Н. Необходимость коррекции иммунной системы у высококвалифицированных гребцов на байдарках // Учен. зап. ун-та им. П.Ф. Лесгафта. 2008. № 1. С. 77–79.
9. Солодков А.С., Сологуб Е.Б. Физиология человека: общая, спортивная, возрастная. М.: Терра-Спорт. 2001. 520 с.
10. Суздальницкий Р.С., Левандо В.А. Новые подходы к пониманию спортивных стрессорных иммунодефицитов // Теория и практика физ. культуры. 2003. № 1. С. 18–22.
11. Хавинсон В.Х., Винер-Усманова И.А., Трофимова С.В. и др. Методика повышения резервных возможностей организма спортсменок высокой квалификации с помощью пептидных биорегуляторов // Методич. рекомендации. СПб., 2010. 22 с.
12. Цыган В.Н., Степанов А.В., Князькин И.В. и др. Иммунореабилитация спортсменов. СПб.: СпецЛит, 2005. 63 с.
13. Allsopp R.C., Vaziri H., Patterson C. et al. Telomere length predicts replicative capacity of human fibroblasts // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1992. Vol. 89. P. 10114–10118.
14. Aviv A., Hunt S.C., Lin J. Impartial comparative analysis of measurement of leukocyte telomere length/DNA content by Southern blots and qPCR // Nucleic Acids Res. 2011. Vol. 39, N 20. P. 1–5.

15. *Balashova S.N., Dudkov A.V., Benberin V.V.* Accelerated ageing prevention in older and very old persons. VI European congress of international association of gerontology and geriatrics // *Adv. in Gerontology*. 2007. Vol. 20, N 3. P. 86.
16. *Benberin V.V., Dudkov A.V.* Effect of peptide cerebroprotector on psycho-emotional status of older and very old patients. VI European congress of international association of gerontology and geriatrics // *Adv. in Gerontology*. 2007. Vol. 20, N 3. P. 88.
17. *Nordfjäll K., Osterman P., Melander O.* hTERT (-1327)T/C polymorphism is not associated with age-related telomere attrition in peripheral blood // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2007. Vol. 358, N 1. P. 215–218.
18. *Ottinger M.A., Lavoie E.* Neuroendocrine and immune characteristics of aging in avian species // *Cytogenet Genome Res.* 2007. Vol. 117, N 1–4. P. 352–357.
19. *Radom-Aizik S., Kaminski N., Hayek S.* et al. Effects of exercise training on quadriceps muscle gene expression in chronic obstructive pulmonary disease // *J. Appl. Physiol.* 2007. Vol. 102(5). P. 1976–1984.
20. *Shay J.W., Wright W.E.* Use of telomerase to create bioengineered tissues // *Ann N.Y. Acad. Sci.* 2005. Vol. 1057. P. 479–491.
21. *Zee R.Y., Castonguay A.J., Barton N.S., Ridker P.M.* Relative leukocyte telomere length and risk of incident ischemic stroke in men: a prospective, nested case-control approach // *Rejuvenation Res.* 2010. Vol. 13, N 4. P. 411–414.

Общее заключение

В начале 70-х годов XX века В.Г. Морозов и В.Х. Хавинсон провели первые исследования, результаты которых послужили основой для создания современной концепции пептидной биорегуляции. Авторы разработали и применили оригинальную методику выделения из различных органов и тканей полипептидов, обладающих иммуномодулирующими, нейропротекторными, геропротекторными, противоопухолевыми и другими биологическими активностями. Затем была создана новая группа биорегуляторов — синтетических коротких пептидов длиной от 2 до 4 аминокислотных остатков. Одним из них стал нейропротекторный антиоксидантный пептид EDR (Glu-Asp-Arg).

В первой главе монографии приводятся данные о нейропротекторных свойствах пептида EDR в культурах коры головного мозга крыс. Установлено, что пептид EDR снижает уровень апоптоза нейронов, оцениваемого по экспрессии белка p53. Кроме того, пептид EDR повышает синтез серотонина в культурах коры головного мозга крыс. Известно, что из серотонина синтезируется N-ацетилсеротонин (NAS) — предшественник мелатонина, который обладает выраженным геропротекторным действием на клетки головного мозга. NAS регулирует когнитивные функции головного мозга, оказывает антидепрессантное и антигипертензивное действие, увеличивает продолжительность жизни и нивелирует влияние β -амилоидных токсинов на нейроны.

Во второй главе описана эффективность пептида EDR в поддержании морфологии нейронов гиппокампа, коры и стриатума в моделях БА и БХ. Было изучено влияние пептида EDR на формирование шипиков в нейронах стриатума в смешанной кортико-стриатной культуре, полученной от мышей линии YAC128 (модель БХ) и в нейронах гиппокампа, полученной от мышей линии C57BL/6 и линии PS1-M146V-KI (модель БА). При исследовании влияния пептида EDR на количество шипиков в нейронах кортико-стриатной культуры мышей линии YAC128 было установлено, что пептид в концентрации 200 нг/мл достоверно увеличивал количество шипиков на 35% по сравнению с этим показателем у мышей с геном мутантного хантингтина человека. При добавлении пептида EDR в концентрации 20 нг/мл достоверного изменения количества шипиков не происходило, но изменялась морфология шипиков — образовывались филоподии: выпячивания дендрита, похожие на шипики, но длиннее его в 2–3 раза. Филоподии яв-

ляются динамичной структурой. Образование филоподий после добавления пептида EDR могло быть связано с попыткой дендрита образовать функциональный контакт с аксоном кортикального нейрона, но данной концентрации было недостаточно. При изучении влияния пептида EDR на количество грибовидных шипиков в нейронах гиппокампа в условиях амилоидной синаптотоксичности (модель БА) установлено, что пептид EDR также оказывал положительный эффект на формирование грибовидных шипиков в концентрациях пептида 20 и 200 нг/мл. После добавления в культуру нейронов гиппокампа в условиях амилоидной синаптотоксичности пептида EDR в концентрации 20 нг/мл количество грибовидных шипиков достоверно увеличивалось на 35%. При добавлении пептида EDR в концентрации 200 нг/мл наблюдалось не только восстановление количества грибовидных шипиков до контрольного значения, но и некоторое увеличение количества грибовидных шипиков по сравнению с контролем (культура без добавления олигопептидов A β 42). Таким образом, пептид EDR в концентрации 200 нг/мл способствовал восстановлению количества грибовидных шипиков нейронов в модели БА на 71% от уровня контроля. Полученные данные позволяют заключить, что пептид EDR оказывал нейропротекторный эффект, восстанавливая количество шипиков дендритов нейронов в моделях БА и БХ на животных.

Третья глава посвящена подтверждению гипотезы о том, что в основе нейропротекторных эффектов пептида EDR лежит возможность его взаимодействия с ДНК и гистоновыми белками, что способствует эпигенетической регуляции синтеза белков в нейронах. Результаты, полученные методами физикохимии, показывают возможность взаимодействия пептида EDR с ДНК в растворе. Пептид EDR оказывает дестабилизирующий эффект на вторичную структуру макромолекулы ДНК и компактизирующее влияние на объем ее молекулярного клубка. Таким образом, в случае контакта пептида EDR с молекулой ДНК в клетке возможно его влияние на функциональные и структурные свойства этой важнейшей биологической макромолекулы. Методом молекулярного моделирования были подобраны два предполагаемых сайта связывания для пептида EDR: d(CCTGCC)₂ и d(CCAGC)₂. С обоими сайтами пептид образует стабильные комплексы. Однако с сайтом d(CCAGC)₂ пептид EDR взаимодействует с большей энергией, что указывает на образование энергетически более выгодного комплекса. В промоторных участках генов TRH1 (ген триптофангидроксилазы – фермента, участвующего в синтезе серотонина), VIM1 (ген виментина)

и CALM1 (ген кальмодулина) были обнаружены предполагаемые сайты связывания для пептида EDR. В генах TPH1 и CALM1 найден один сайт связывания, а в гене VIM1 – два сайта связывания. Анализ промоторных участков генов, кодирующих белки, регулирующие функциональную и антиоксидантную активность клеток (PPARA, PPARG, HSPA1A, SOD2, GPX1), также указывает на наличие сайтов связывания для пептида EDR. Так, для генов PPARA и GPX1 обнаружено по 3 предполагаемых сайта связывания, для PPARG – 5 сайтов, для HSPA1A – 4 сайта связывания.

При исследовании связывания FITC-меченных гистонов пшеницы с короткими пептидами *in vitro* по тушению флуоресценции было обнаружено, что пептид EDR связывается с гистонами H1.1, H1.3, H1.6, H2b, H3 и H4. Эти данные были подтверждены результатами молекулярного моделирования. Установлено, что с гистонами H4 пептид EDR в основном образует сеть водородных связей с остатками, образующими мотивы Gly14-Ala15-Lys16 и Leu22-Arg23, Asn25. Пептид EDR образует сеть водородных связей с участком гистона H3, образованным аминокислотными остатками Arg8-Lys9, Arg17, Arg26-Lys27, Ala31. Пептид EDR связывается с гистонами H2b по сайту Ala29-Gly30-Pro40-Gly42-Lys43-Ser44. В случае гистона H1.6 наиболее энергетически выгодный комплекс пептид EDR образует по сайту Ser51-Ile54-Ala55-Leu57-Lys58-Glu59-Gly62-Pro114-Ala115, а в случае гистона H1.3 – с аминокислотными остатками His53, Tyr56, His89, Arg95-Lys96. С гистонами H1.1 наиболее энергетически выгодный комплекс пептид EDR образует в петлях с аминокислотными остатками Ile72-Thr73, Glu77-Arg78, Lys134, Lys136.

В главе 4 описано влияние пептида EDR на гипоксию головного мозга в моделях *in vivo* и *in vitro*. Инъекции пептида EDR беременным крысам способствовали улучшению пространственной ориентации и обучаемости потомства при проведении теста «вводный лабиринт Морриса». Предполагается, что защитное действие пептида EDR связано с его способностью подавлять накопление АФК, повышая их устойчивость к окислительному стрессу и предотвращая взаимодействие гомоцистеина и его производных с рецепторами глутамата. Антиоксидантный эффект пептида EDR в модели гипергомоцистеинемии наблюдается при низких концентрациях пептида. На гранулярных клетках мозжечка была проведена оценка влияния пептида EDR на активацию MAP-киназы, профиль которой определяет, какие гены будут экспрессироваться – гены адаптации или апоптоза. Выявлено, что в присутствии пептида EDR лаг-период активации MAP-киназы удлиняется, что

можно рассматривать как защитный эффект от токсического действия гомоцистеина.

В главах 1–4 было показано, что пептид EDR оказывает эпигенетическое влияние на экспрессию генов в нейронах млекопитающих (крысы и мыши), способствуя активации процессов нейропластичности и повышению функциональной активности нейронов головного мозга, обладает антиоксидантным действием.

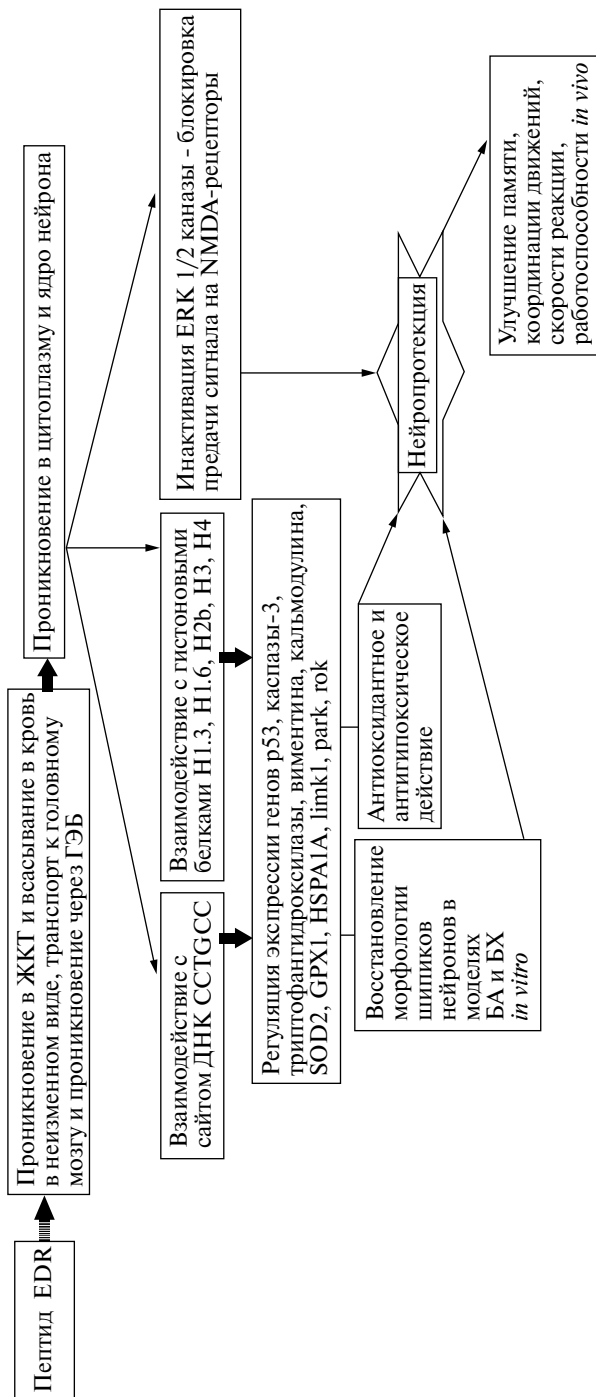
В главе 5 сходные нейропротекторные свойства пептида EDR были выявлены у насекомых. Установлено, что пептид EDR стимулирует процесс формирования способности к сохранению памяти у медоносных пчел (*Aris mellifera L.*) с исходно низкой пищевой мотивацией и ингибирует этот процесс у пчел с исходно высокой пищевой мотивацией. То есть пептид EDR обладает выраженной модулирующей способностью в зависимости от высокого или низкого условно-рефлекторного фона. Проведенные исследования позволили сделать вывод о влиянии пептида EDR на функцию высших отделов ЦНС, ответственных за когнитивную деятельность, у насекомых.

Кроме того, пептид EDR повышает локомоторную активность в модели болезни Паркинсона у *Drosophila melanogaster* (дрозофилы с деменцией и тельцами Леви – мутант Agnst3 локуса agnostic, несущего дефектный ген LIM-киназы) в нормальных условиях и при стрессорном воздействии. Пептид EDR восстанавливает краткосрочную память у мутанта Agnst3. Вероятно, что пептид EDR оказывает свое влияние на локомоторное поведение и память через уменьшение уровня экспрессии гена *limk 1*.

В главе 6 приведены результаты исследований по изучению влияния пептида EDR на резервные возможности организма у спортсменов и психоэмоциональное состояние лиц пожилого возраста. Установлено, что пероральное применение пептида EDR у гимнасток и гребцов способствовало улучшению показателей антиоксидантной и иммунной систем, повышению работоспособности, замедлению ускоренного старения организма, вызванного высокими физическими нагрузками, в основе чего лежит нормализация экспрессии гена БТШ HSPA1A. Сочетанное пероральное применение пептидов EDR и KED способствовало нормализации памяти и психоэмоционального состояния у мужчин пожилого возраста.

Таким образом, установлено, что пептид EDR обладает нейропротекторным действием на различных уровнях организации живой материи – от нейронов до целого организма. Кроме того, нейропротекторные свойства пептида EDR проявляются у различных видов: насекомых, грызунов и человека. В исследованиях на животных и насекомых пептид EDR показал эффективность

Предполагаемая схема нейропротекторного действия пептида EDR



при моделировании нейродегенеративных заболеваний: болезней Альцгеймера, Хантингтона и Паркинсона. Кроме того, нейропротекторное и стресс-протекторное действие пептида EDR при его пероральном применении наблюдается у спортсменов и лиц пожилого возраста.

Приведенные в монографии данные и сведения из литературы по вопросам пептидной регуляции и нейропротекции позволяют предложить следующую возможную схему нейропротекторного действия пептида EDR. Разработанная пероральная форма пептида EDR (Пинеалон) либо этот пептид, образованный при гидролизе белков, поступают в организм с пищей и в желудочно-кишечный тракт (ЖКТ). Из ЖКТ пептид EDR, не подвергаясь действию пептидаз, в неизмененном виде поступает в кровь. Из крови пептид EDR транспортируется к головному мозгу, проникает через гемато-энцефалический барьер (ГЭБ) и действует непосредственно на нейроны. Пептид EDR может проникать в цитоплазму и ядро нейрона и далее действовать одним, двумя или всеми тремя указанными на схеме путями: взаимодействовать со специфическим сайтом связывания в ДНК, с гистоновыми белками или инактивировать фермент ERK 1/2 киназы. В первых двух случаях пептид EDR будет регулировать ряд генов, как показано на схеме, а в третьем случае блокировать активность NMDA-рецепторов. В обоих случаях это приводит к снижению апоптоза нейронов. В первом и втором варианте помимо антиапоптотического действия пептид EDR может активировать синтез серотонина и других биологически активных молекул, синтезируемых нейронами, оказывать антиоксидантное действие, регулировать ремоделирование цитоскелета. Все эти эффекты будут способствовать антигипоксическому, антистрессорному и нейропротекторному действию пептида. Это подтверждается данными по восстановлению морфологии шипиков нейронов в моделях нейродегенеративных заболеваний на животных и улучшением памяти, работоспособности, координации движений, скорости реакции у людей, подверженных высоким психоэмоциональным и физическим нагрузкам (спортсмены), и лиц пожилого возраста.

* * *

Авторы выражают глубокую благодарность заведующей лабораторией фармакологии пептидов Санкт-Петербургского института биорегуляции и геронтологии доктору биологических наук Попович Ирине Григорьевне за помощь в работе над текстом монографии, заведующему лабораторией молекулярной нейродеге-

нерации Санкт-Петербургского политехнического университета Петра Великого доктору биологических наук Безпрозванному Илье Борисовичу и заведующей кафедрой «Медицинская физика» Санкт-Петербургского политехнического университета Петра Великого доценту, доктору физико-математических наук Власовой Ольге Леонардовне за возможность проведения исследований нейропротекторных свойств пептидов в моделях нейродегенеративных заболеваний.

Оглавление

Предисловие	3
Принятые сокращения и определения	5
Введение	12
Глава 1. Пептид EDR – регулятор экспрессии сигнальных молекул в культурах нейронов головного мозга <i>(соавторы Кветной И.М., Полякова В.О., Миронова Е.С., Ильина А.Р., Богатырев А.Н.)</i>	14
1.1. Сигнальные молекулы – маркеры функциональной активности головного мозга	14
1.2. Методология исследования влияния пептида EDR на экспрессию сигнальных молекул в культурах нейронов головного мозга	17
1.3. Влияния пептида EDR на экспрессию сигнальных молекул в культурах нейронов головного мозга	19
1.3.1. Влияние пептида EDR на экспрессию апоптотического белка p53 в культурах нейронов головного мозга	19
1.3.2. Влияние пептида EDR на экспрессию виментина в культурах нейронов головного мозга	20
1.3.3. Влияние пептида EDR на экспрессию серотонина в культурах нейронов головного мозга	22
1.3.4. Влияние пептида EDR на экспрессию кальмодулина в культурах нейронов головного мозга	23
Заключение	25
Литература	25
Глава 2. Клеточные аспекты нейропротекторного действия пептида EDR в моделях нейродегенеративных заболеваний <i>in vitro</i> <i>(соавторы Кожевникова Е.О., Красковская Н.А., Большакова А.В., Попугаева Е.А.)</i>	28

2.1. Нейродегенеративные заболевания как возрастная патология	28
2.2. Молекулярные аспекты болезни Альцгеймера и Хантингтона	29
2.2.1. Болезнь Альцгеймера	29
2.2.2. Болезнь Хантингтона	32
2.3. Дендритные шипики и синаптическая передача: роль в патогенезе нейродегенеративных заболеваний	34
2.4. Методология исследования влияния пептида EDR на количество шипиков нейронов в моделях болезни Альцгеймера и Хантингтона	36
2.5. Влияние пептида EDR на количество шипиков нейронов в модели болезни Альцгеймера	40
2.6. Влияние пептида EDR на количество шипиков нейронов в модели болезни Хантингтона	42
Заключение	45
Литература	48
Глава 3. Биофизические аспекты взаимодействия пептида EDR с ДНК и гистоновыми белками	52
3.1. Проникновение коротких пептидов в клетку и взаимодействие с ДНК и гистоновыми белками: факты и гипотезы	52
3.2. Исследование взаимодействия пептида EDR с ДНК <i>in vitro</i> (соавторы Касьяненко Н.А., Морозова Е.А., Кузнецова Е.П.)	56
3.3. Исследование взаимодействия пептида EDR с ДНК <i>in silico</i> (соавторы Тарновская С.И., Миронова Е.С.)	67
3.4. Исследование взаимодействия пептида EDR с гистоновыми белками <i>in silico</i> (соавторы Тарновская С.И., Ильина А.Р., Дудков А.В.)	79
Заключение	89
Литература	91
Глава 4. Влияние пептида EDR на гипоксию головного мозга в моделях <i>in vivo</i> и <i>in vitro</i> (соавторы Козина Л.С., Рыжак Г.А., Менджерцкицкий А.М., Карантыш Г.В., Арутюнов В.А., Лысенко А.В.)	93
4.1. Оценка антиоксидантных, мембранопротекторных и актопротекторных свойств пептида EDR при гипоксии и других экстремальных воздействиях	98
4.2. Влияние пептида EDR на моноаминергические системы мозга при гипоксии	109

4.3. Оценка защитных свойств пептида EDR в модели острой и пренатальной гипобарической гипоксии	114
4.3.1. Влияние пептида EDR на активность и уровень активной каспазы-3 в мозге и обучаемость у крыс разного возраста при гипобарической гипоксии.	114
4.3.2. Влияние пептида EDR на поведенческие реакции, показатели антиоксидантной системы беременных самок крыс, подвергнутых воздействию острой гипобарической гипоксии, а также на поведенческие реакции их потомства	121
4.4. Влияние пептида EDR на окислительный стресс, вызываемый в нейронах убаином или пероксидом водорода	126
4.5. Участие пептида EDR во внутриклеточных сигнальных механизмах.	129
4.6. Влияние пептида EDR и других биологически активных соединений на клеточный цикл.	133
Заключение	137
Литература	138

Глава 5. Нейропротекторные свойства пептида EDR в экспериментах на насекомых 141

5.1. Влияние пептида EDR на условно-рефлекторную деятельность медоносной пчелы <i>Aris mellifera L.</i> (соавторы Чалисова Н.И., Лопатина Н.Г.).	141
5.2. Нейропротекторное действие пептида EDR в модели болезни Паркинсона у <i>Drosophila melanogaster</i> (соавторы Саватеева-Попова Е.В., Захаров Г.А.)	147
Заключение	159
Литература	159

Глава 6. Перспективы практического применения пептида EDR (соавторы Рыжак Г.А., Трофимова С.В., Винер-Усманова И.А., Дудков А.В., Лысенко А.В., Лысенко Д.С.) 161

6.1. Эффективность перорального применения пептида EDR в сочетании с другими короткими пептидами у спортсменов.	161
6.1.1. Эффективность перорального применения пептида EDR в сочетании с другими короткими пептидами у спортсменок высокой квалификации по художественной гимнастике	161

6.1.2. Эффективность перорального применения пептида EDR в сочетании с другими короткими пептидами у спортсменов высокой квалификации, специализирующихся в циклических видах спорта	168
6.1.3. Влияние перорального применения пептида EDR на физическую и умственную работоспособность спортсменов-борцов разного возраста	182
6.2. Эффективность перорального применения пептидов EDR и KED для коррекции психоэмоционального состояния у мужчин пожилого возраста	190
Заключение	201
Литература	202
Общее заключение	204
Сведения об авторах	220

Contents

Preface	3
Abbreviations	5
Introduction	12
Chapter 1. EDR peptide regulates signal molecules expression in the cell cultures of cerebral neurons <i>(co-authors Kvetnoy I.M., Polyakova V.O., Mironova E.S., Ilina A.R., Bogatyrev A.N.)</i>	14
1.1. Signal molecules are markers of the brain functional activity.	14
1.2. Research methodology of the EDR peptide's effect on the signal molecules expression in the cell cultures of cerebral neurons.	17
1.3. EDR peptide's effect on the signal molecules expression in the cell cultures of cerebral neurons	19
1.3.1. EDR peptide's effect on the apoptotic protein p53 expression in the cell cultures of cerebral neurons.	19
1.3.2. EDR peptide's effect on the vimentin expression in the cell cultures of cerebral neurons	20
1.3.3. EDR peptide's effect on the serotonin expression in the cell cultures of cerebral neurons	22
1.3.4. EDR peptide's effect on the calmodulin expression in the cell cultures of cerebral neurons.	23
Conclusion	25
References.	25
Chapter 2. Cell aspects of EDR peptide's neuroprotective effect in neurodegenerative diseases models <i>in vitro</i> <i>(co-authors Kozhevnikova E.O., Kraskovskaya N.A., Bolshakova A.V., Popugaeva E.A.)</i>	28
2.1. Neurodegenerative diseases as age-related pathology	28
2.2. Molecular aspects of Alzheimer's and Huntington's diseases.	29

2.2.1. Alzheimer's disease	29
2.2.2. Huntington's disease	32
2.3. Role of dendritic spines and synaptic transmission in the pathogenesis of neurodegenerative diseases.	34
2.4. Research methodology of the EDR peptide's effect on the number of neuron spines in Alzheimer's and Huntington's diseases models	36
2.5. EDR peptide's effect on the number of neuron spines in Alzheimer's diseases models	40
2.6. EDR peptide's effect on the number of neuron spines in Huntington's diseases models.	42
Conclusion	45
References.	48

Chapter 3. Biophysical aspects of the EDR peptide's interaction with DNA and histone proteins. 52

3.1. Penetration of short peptides into the cell, their interaction with DNA and histone proteins: facts and hypotheses	52
3.2. Research of the EDR peptide's interaction with DNA <i>in vitro</i> (co-authors Kasyanenko N.A., Morozova E.A., Kuznetsova E.P.)	56
3.3. Research of the EDR peptide's interaction with DNA <i>in silico</i> (co-authors Tarnovskaya S.I., Mironova E.S.)	67
3.4. Research of the EDR peptide's interaction with histone proteins <i>in silico</i> (co-authors Tarnovskaya S.I., Ilina A.R., Dudkov A.V.)	79
Conclusion	89
References.	91

Chapter 4. EDR peptide's effect in brain hypoxia in models *in vivo* and *in vitro*
 (co-authors Kozina L.S., Ryzhak G.A., Mendzheritsky A.M., Karantysh G.V., Arutyunov V.A., Lysenko A.V.) 93

4.1. Evaluation of antioxidant, membrane-protective and actoprotective properties of the EDR peptide in hypoxia and other extreme influences.	98
4.2. EDR peptide's effect on monoaminergic brain systems in hypoxia.	109
4.3. Evaluation of the EDR peptide's protective properties in acute and prenatal hypobaric hypoxia models.	114

4.3.1. EDR peptide's effect on the activity, level of active caspase-3 in brain, and the learning ability of different ages rats in hypobaric hypoxia	114
4.3.2. EDR peptide's effect on behavioral reactions and antioxidant system indicators of pregnant female rats exposed to hypobaric hypoxia and their offspring	121
4.4. EDR peptide's effect on oxidative stress caused in neurons by ouabain or hydrogen peroxide	126
4.5. EDR peptide's participation in intracellular signaling mechanisms	129
4.6. The effect of EDR peptide and other bioactive compounds on the cell cycle.	133
Conclusion	137
References.	138

Chapter 5. EDR peptide's neuroprotective properties in experiments on insects 141

5.1. EDR peptide's influence on conditioned reflex of honeybee <i>Aris mellifera L.</i> activity (co-authors <i>Chalisova N.I., Lopatina N.G.</i>)	141
5.2. EDR peptide's neuroprotective effect in Parkinson's disease model in <i>Drosophila melanogaster</i> (co-authors <i>Savateeva-Popova E.V., Zakharov G.A.</i>)	147
Conclusion	159
References.	159

Chapter 6. Prospects of practical application of the EDR peptide (co-authors *Ryzhak G.A., Trofimova S.V., Viner-Usmanova I.A., Dudkov A.V., Lysenko A.V., Lysenko D.S.*) 161

6.1. The effectiveness of oral application of EDR peptide in combination with other short peptides in athletes	161
6.1.1. The effectiveness of oral application of EDR peptide in combination with other short peptides in top-level rhythmic gymnasts.	161
6.1.2. The effectiveness of oral application of EDR peptide in combination with other short peptides in top-level athletes doing cyclical sports	168
6.1.3. The effect of oral application of EDR peptide on physical and mental performance of wrestlers of various age groups.	182

6.2. The effectiveness of oral application of EDR and KED peptides
for psycho-emotional state correction in older males 190

Conclusion 201

References. 202

Conclusion. 204

Abstract. 219

Information about authors 220

Abstract

Drugs used for treatment of brain pathology specifically in the older patients belong to different pharmacological groups. These groups include antioxidants, nitrogen oxide blocking agents, inhibitors of lipid peroxidation processes, etc. Short peptides revealing high physiological activity and the absence of side effects are currently considered to be promising neuroprotective agents. The monograph is dedicated to one of the newest developments of the St. Petersburg Institute of Bioregulation and Gerontology – neuroprotective peptide EDR (Glu-Asp-Arg). The monograph summarizes the results of molecular and cellular aspects of EDR peptide's neuroprotective effect. It is noted that EDR peptide regulates the expression of signal molecules, serotonin and pro-apoptotic protein p53 in dissociated cultures of rat cerebral cortical neurons, which are markers of the functional activity of cells. In addition, it is shown that in Alzheimer's and Huntington's diseases models, EDR peptide restores the number of neuronal dendritic spines, which is characteristic of its ability to normalize interneural interactions. Neuroprotective role of the EDR peptide is manifested in experimental prenatal hypoxia and hyperhomocysteinemia. EDR peptide reduces the accumulation of reactive oxygen species in neurons, thus increasing their resistance to oxidative stress and preventing the interaction of homocysteine and its derivatives with glutamate receptors. Suggests that the revealed neuroprotective properties of EDR peptide are associated with its ability to penetrate into cell's nucleus and nucleolus, bind with the DNA or histone proteins, thus regulating gene expression and synthesis of proteins implementing neuronal functions of the brain. Oral application of EDR peptide contributed to the regulation of heat shock protein gene expression, increased physical activity and performance capabilities in athletes, and normalized memory, psycho-emotional state in the senior patients.

For neurologists and geriatricians, specialists in the field of molecular biology, biophysics, cell technologies and bioinformatics.

Сведения об авторах



ХАВИНСОН Владимир Хацкелевич – директор Санкт-Петербургского института биорегуляции и геронтологии (консультативного центра ЭКОСОС ООН по вопросам старения), президент Европейской ассоциации геронтологии и гериатрии (2011–2015 гг.), первый вице-президент Геронтологического общества РАН, заведующий лабораторией качества личности Северо-Западного института управления Российской академии народного хозяйства и государственной службы при Президенте РФ, главный научный сотрудник Института физиологии им. И.П. Павлова РАН, главный геронтолог Комитета по здравоохранению Правительства Санкт-Петербурга, член-корреспондент РАН, заслуженный деятель науки РФ, заслуженный изобретатель РФ, профессор, доктор медицинских наук, лауреат премий Совета Министров СССР и АН СССР, иностранный член (академик) Национальной академии медицинских наук Украины, лауреат премий Национальной академии наук и НАМН Украины. Автор более 1000 научных работ, более 200 патентов, 6 лекарственных препаратов и 39 пептидных биорегуляторов.



УМНОВ Роман Сергеевич — кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник лаборатории биogerонтологии Санкт-Петербургского института биорегуляции и геронтологии. Автор 30 научных работ.

ЛИНЬКОВА Наталья Сергеевна — доцент, доктор биологических наук, заведующая лабораторией молекулярных механизмов старения Санкт-Петербургского института биорегуляции и геронтологии, доцент кафедры «Медицинская физика» Санкт-Петербургского политехнического университета Петра Великого. Автор более 250 научных работ.





**АРУТЮНЯН Александр Вар-
танович** – профессор, доктор
биологических наук, заслу-
женный деятель науки РФ, за-
ведующий лабораторией био-
химии Санкт-Петербургского
института биорегуляции и ге-
ронтологии, ведущий научный
сотрудник НИИ акушерства,
гинекологии и репродуктоло-
гии им. Д.О. Отта. Автор более
350 научных работ.

Научное издание

Владимир Хацкелевич Хавинсон
Роман Сергеевич Умнов
Наталья Сергеевна Линькова
Александр Вартанович Арутюнян

**МОЛЕКУЛЯРНО-КЛЕТОЧНЫЕ МЕХАНИЗМЫ
ПЕПТИДЕРГИЧЕСКОЙ РЕГУЛЯЦИИ
ФУНКЦИЙ МОЗГА**

Утверждено к печати
Ученым советом Института физиологии им. И.П. Павлова РАН,
Президиумом Геронтологического общества РАН,
Ученым советом Санкт-Петербургского института
биорегуляции и геронтологии

Редактор *Л.С. Аюпова*
Художник *В.Ю. Яковлев*
Корректоры: *Р.В. Молоканова,*
В.П. Терехов, М.Н. Филатова

Подписано к печати 08.02.2019. Формат 60×90¹/₁₆
Гарнитура Newton. Печать офсетная
Усл.печ.л. 17,0. Уч.-изд.л. 16,5
Тип. зак.

ФГУП Издательство «Наука»
117997, Москва, Профсоюзная ул., 90

E-mail: info@naukaran.com
naukapublishers.ru

ФГУП Издательство «Наука»
(Типография «Наука»)
121099, Москва, Шубинский пер., 6