

На правах рукописи



Огнева Настасья Сергеевна

Исследование механизма противовоспалительного действия синтетических производных динорфина YdAGFLR и YdAGFLRR-NH₂ на модели острого воспаления легких

3.3.6. Фармакология, клиническая фармакология

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Москва – 2026

Работа выполнена на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Научный центр биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства»

Научный руководитель:

доктор медицинских наук, профессор

Каркищенко Владислав Николаевич

Официальные оппоненты:

Макарова Ольга Васильевна – доктор медицинских наук, профессор, Научно-исследовательский институт морфологии человека» им. академика А.П. Авцына Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Российский научный центр хирургии имени академика Б. В. Петровского», лаборатория Иммуноморфологии воспаления, заведующий лабораторией

Самородов Александр Владимирович – доктор медицинских наук, доцент, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений», лаборатория трансляционных исследований Центра доклинических исследований, заведующий лабораторией

Ведущая организация: Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита состоится «22» сентября 2026 г. в 12:00 на заседании диссертационного совета ДСУ 208.001.20 при ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) по адресу: 119991, г. Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2

С диссертацией можно ознакомиться в Фундаментальной учебной библиотеке ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) по адресу: 119034, г. Москва, Зубовский бул., д. 37/1 и на сайте организации <https://www.sechenov.ru>

Автореферат разослан «___» _____ 202__ года

Ученый секретарь диссертационного совета
доктор медицинских наук, профессор



Дроздов Владимир Николаевич

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Пневмония – острое инфекционное заболевание легких, характеризующееся очаговым поражением респираторных отделов легких, обязательным наличием внутриальвеолярной экссудации и воспалением. В России заболеваемость внебольничной пневмонией в 2019 г. среди взрослого населения составила 410 человек на 100 тыс. населения. По данным Всемирной Организации Здравоохранения (ВОЗ) за 2023-2024 гг. пневмония занимает 4-е место по летальности от инфекционных заболеваний (~ 2,5 млн человек). Рост заболеваемости внебольничной пневмонией в 3,6 раза (1856,18 на 100 тыс. населения) и вирусной пневмонией в 109 раз (783,08 на 100 тыс. населения) был отмечен в 2020 г. по сравнению с 2019 г. на фоне пандемии новой коронавирусной инфекции COVID-19 [Жигарловский и др., 2021]. Внебольничная пневмония может вызываться разнообразными этиологическими факторами (>100), в основном бактериями, такими как *S. Pneumoniae*, *M. pneumoniae*, *C. Pneumoniae*, *H. Influenzae*, *S. Aureus*, а также вирусами гриппа, вирусом SARS-CoV-2, грибами и простейшими [Рачина и др., 2017; Игореvич, 2006]. Основой лечения пневмонии является антибактериальная терапия. Однако, несмотря на наличие широкого арсенала антибактериальных средств, по-прежнему сохраняется высокий уровень осложнений и летальности, особенно у пациентов пожилого возраста с коморбидными патологиями [Reyes et al., 2025]. Ключевым звеном в патогенезе повреждения легочной ткани при пневмонии является избыточная и неконтролируемая воспалительная реакция, которая может приводить к острому респираторному дистресс-синдрому (ОРДС) и дыхательной недостаточности. Опыт, полученный в ходе пандемии COVID-19, показал необходимость противовоспалительной терапии в дополнение к антибактериальной и противовирусной [Dequin et al., 2023]. Противовоспалительная терапия тяжелых форм пневмонии, в том числе связанных с COVID-19, основана на применении глюкокортикостероидов (ГКС), действие которых неспецифично и охватывает большинство компонентов и стадий воспаления. ГКС увеличивают шанс

благоприятного исхода при тяжелой форме пневмонии [Chaudhuri et al., 2024; Jiang et al., 2019], но клинические руководства не рекомендуют применение ГКС при более легких формах пневмонии из-за повышения риска гипергликемии, иммуносупрессии и развития вторичных инфекций, когда нежелательные эффекты от приема ГКС перевешивают пользу [Jones et al., 2026]. Таким образом, существует необходимость в эффективной и безопасной противовоспалительной терапии при пневмониях легкой и средней степени тяжести.

Пептиды – быстро развивающийся класс фармакологических средств, характеризующийся высокой специфической активностью и безопасностью. Динорфины – семейство эндогенных пептидов, обладающих противовоспалительной активностью. В ряде исследований была показана принципиальная возможность создания новых противовоспалительных средств путем модификации исходной структуры динорфина. Один из таких пептидов, гексапептид Tyr-D-Ala-Gly-Phe-Leu-Arg, имеющий международное непатентованное наименование тирозил-D-аланил-глицил-фенилаланил-лейцил-аргинина диацетат, показал высокую эффективность при лечении COVID-19 легкой и средней степени тяжести в составе отечественного лекарственного препарата, получившего государственную регистрацию в 2021 г. Введение этого гексапептида в клиническую практику положило начало новому классу противовоспалительных препаратов на основе производных динорфина, восполняющих дефицит средств лечения воспаления при пневмониях легкой и средней степени тяжести. Однако, механизм противовоспалительного действия производных динорфина изучен недостаточно. Таким образом, изучение механизма противовоспалительного действия производных динорфина на модели острого воспаления легких, релевантной пневмонии у человека, является актуальной научной задачей, решение которой имеет важное теоретическое и практическое значение.

Степень разработанности темы исследования

Имеется лишь ограниченный набор данных о противовоспалительной активности эндогенных динорфинов [Morgan et al., 2012; Morgan et al., 2017; Stein et al., 1989; Fazalul Rahiman et al., 2016; Ballouze et al., 2023] и синтетических

производных лейэнкефалина [Fu et al., 2021; Tang et al., 2011]. Основные данные о противовоспалительном механизме действия динорфинов получены при исследовании Tyr-D-Ala-Gly-Phe-Leu-Arg, согласно которым действие этого пептида связана с его опиоидной активностью и способностью активировать транскрипцию гистоновой деацетилазы сиртуин 1 (SIRT1), влияющей на сигнальные пути, связанные с секрецией провоспалительного белка бокс 1 группы белков высокой подвижности (HMGB1) [Karkischenko et al., 2021] и транскрипцией провоспалительных цитокинов [Каркищенко и др., 2020]. Неизвестно, однако, может ли выявленный индивидуальный эффект гексапептида экстраполироваться на другие производные динорфина и как этот пептид и другие производные динорфина влияет на транскрипцию других членов семейства сиртуинов. Неизвестно также, на какой стадии воспалительного процесса реализуется эффект производных динорфина. Все эти вопросы являются предметом настоящего исследования.

Цель и задачи исследования

Цель исследования – изучить механизм противовоспалительного действия синтетических производных динорфина на модели острого воспаления легких.

Задачи исследования:

1. Валидировать ингаляционный способ введения пептидов мышам с острым воспалением легких с использованием вновь разработанной аэрозольной камеры.
2. Изучить влияние гексапептида YdAGFLR и гептапептида YdAGFLRR-NH₂ при ингаляционном введении на транскрипцию генов сиртуинов 1-7 в легких мышей C57Bl/6Y в условиях острого воспаления.
3. Изучить влияние гексапептида YdAGFLR при ингаляционном введении на динамику изменения уровней мРНК SIRT1, IL-1 β , TNF- α и IL-6 в легких мышей C57Bl/6Y в условиях острого воспаления в временном интервале 0,25 – 72 часа.
4. Изучить влияние гексапептида YdAGFLR при ингаляционном введении на динамику изменения уровней цитокинов IL-1 β , TNF- α и IL-6 в бронхоальвеолярном лаваже из легких мышей C57Bl/6Y в условиях острого воспаления.

5. Изучить влияние гексапептида YdAGFLR на иммуносупрессию, связанную с подавлением продукции провоспалительных цитокинов на ранней стадии воспаления.

Научная новизна

В настоящем исследовании впервые показано, что противовоспалительный эффект синтетических производных динарфина гексапептида YdAGFLR и гептапептида YdAGFLRR-NH₂ включает повышение транскрипции двух ядерных противовоспалительных сиртуинов SIRT1 и SIRT6, а также противовоспалительного цитозольного сиртуина SIRT2, а не только сиртуина SIRT1, как было показано для YdAGFLR ранее, что расширяет представления о характере действия синтетических производных динарфина. Впервые показано, что известный эффект YdAGFLR на транскрипцию SIRT1 не является изолированным эффектом только этого соединения, но характерен и для других производных динарфина. Впервые показано, что индукция воспаления легких вызывает синхронные колебания уровней мРНК провоспалительных цитокинов и SIRT1 в легких, причем в ранней фазе воспаления преобладают мРНК цитокинов, тогда как в поздней фазе разрешения воспаления мРНК SIRT1 преобладает, что соответствует известной гипотезе о том, что SIRT1 является фактором отрицательной обратной связи в транскрипции цитокинов и фактором разрешения воспаления. Впервые показано на примере YdAGFLR, что производные динарфина могут снижать амплитуды осцилляций мРНК провоспалительных цитокинов, одновременно повышая транскрипцию SIRT1. Впервые показано на примере YdAGFLR, что производные динарфина могут снижать экспрессию провоспалительных цитокинов в фазе разрешения воспаления, не влияя при этом на экспрессию этих же цитокинов в ранней фазе развития воспаления.

Теоретическая и практическая значимость работы

Теоретическая значимость настоящего исследования заключается в том, что на примере гексапептида YdAGFLR и гептапептида YdAGFLRR-NH₂ уточнен механизм противовоспалительного действия производных динарфина, который заключается в повышении транскрипции генов противовоспалительных сиртуинов

SIRT1, SIRT2 и SIRT6 в очаге воспаления, что способствует разрешению воспаления через снижение экспрессии провоспалительных цитокинов в поздней фазе воспаления, но не влияет на экспрессию этих цитокинов в ранней фазе воспаления. Этот способ регуляции воспалительного ответа указывает на то, что производные динорфина не вызывают иммуносупрессию, связанную с недостаточной продукцией медиаторов воспаления, но при этом способствуют разрешению воспаления. Практическая значимость исследования состоит в том, что выявленный в настоящем исследовании механизм противовоспалительного действия гексапептида YdAGFLR, уточняет механизм противовоспалительного действия оригинального отечественного лекарственного препарата для лечения воспаления при COVID-19, в состав которого в качестве действующего вещества входит YdAGFLR.

Методология и методы исследования

Объектами исследования являются мелкие лабораторные животные – мыши линии C57Bl6Y. Методология исследования построена на измерениях уровней мРНК провоспалительных цитокинов IL-1 β , TNF- α и IL-6 и сиртуинов SIRT1, SIRT2, SIRT3, SIRT4, SIRT5, SIRT6 и SIRT7 в очаге воспаления методом ПЦР в реальном времени на биомодели острого воспаления легких у мышей C57Bl/6Y, индуцированного последовательным введением α -галактоцерамида, стимулятора инвариантных естественных киллерных Т-клеток, и липополисахарида *E. coli*, агониста TLR4, в широком временном интервале до 72 часов с момента индукции воспаления. Уровни экспрессии провоспалительных цитокинов IL-1 β , TNF- α и IL-6 в ранней фазе воспаления (первые 6 часов) и в поздней фазе воспаления (18 – 72 часа) измерялись с использованием мультиплексного иммуноферментного анализа на магнитных частицах. Распределение гексапептида YdAGFLR в легких и крови после введения в легкие с использованием аэрозольной камеры определяли с использованием ВЭЖХ-МС высокого разрешения. Для анализа результатов использовали статистические методы анализа, такие как непарный двусторонний *t*-тест Стьюдента, непараметрический тест Манна-Уитни, однофакторный

дисперсионный анализ (one-way ANOVA), двухфакторный дисперсионный анализ (two-way ANOVA) с апостериорными тестами Даннетта и Сидака.

Положения, выносимые на защиту

1. Синтетические производные динорфина, гексапептид YdAGFLR и гептапептид YdAGFLRR-NH₂, повышают транскрипцию противовоспалительных сиртуинов SIRT1, SIRT2 и SIRT6 в легких мышей C57Bl/6Y в условиях моделирования острого воспаления легких.

2. Индукция воспаления легких у мышей C57Bl/6Y вызывает осцилляции мРНК провоспалительных цитокинов IL-1 β , TNF- α и IL-6, а также мРНК противовоспалительного SIRT1, причем в ранней фазе воспаления (0,25 – 6 часов) превалируют мРНК цитокинов, а в поздней фазе воспаления (18 – 72 часа) мРНК SIRT1, что соответствует известной гипотезе о том, что SIRT1 является фактором разрешения воспаления.

3. Синтетические производные динорфина на примере YdAGFLR вызывают снижение уровней мРНК провоспалительных цитокинов IL-1 β , TNF- α и IL-6 в очаге воспаления, с одновременным повышением уровней мРНК противовоспалительного сиртуина SIRT1 по сравнению с контролем, что является основным механизмом противовоспалительного действия YdAGFLR.

4. Синтетические производные динорфина на примере YdAGFLR вызывают снижение концентраций провоспалительных цитокинов IL-1 β , TNF- α и IL-6 в бронхолегочном лаваже у мышей C57Bl/6Y с острым воспалением легких, но только в поздней фазе разрешения воспаления, не влияя на уровни концентраций цитокинов в ранней фазе развития воспаления.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Выполненное исследование по цели и результатам соответствует паспорту специальности 3.3.6. Фармакология, клиническая фармакология; и направлению исследований пункт 5 «Исследование механизмов действия фармакологических веществ в экспериментах на животных, на изолированных органах и тканях, а также на культурах клеток».

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность полученных результатов основана на выборе методов исследования, которые соответствуют цели, объекту и задачам исследования; использовании достаточного количества животных в группах сравнения и адекватных методов статистического анализа данных исследования; а также высокой степени согласованности результатов исследования. Результаты исследования были представлены на конференциях: XX ежегодная научно-практическая межрегиональная конференция «БИОМЕДИЦИНА И БИОМОДЕЛИРОВАНИЕ», XXI ежегодная научно-практическая межрегиональная конференция «БИОМЕДИЦИНА И БИОМОДЕЛИРОВАНИЕ, 7-ой Съезд врачей неотложной медицины «Ключевые точки оптимизации скорой, экстренной и неотложной медицинской помощи в РФ» (18–19.09.2025 г., Москва).

Личный вклад автора

Автор лично провел анализ научной литературы по теме диссертации, принимал непосредственное участие в постановке целей, задач и разработке планов и протоколов исследования. Автором были выполнены все этапы экспериментального исследования, получены, обработаны и проанализированы данные экспериментов, подготовлены публикации, полностью отражающие все полученные результаты. Доклады по теме диссертации были представлены лично автором на всероссийских научных конференциях.

Публикации по теме диссертации

По результатам исследования автором опубликовано 7 научных работ, в том числе 6 научных статей в журналах, включенных в Перечень ВАК при Минобрнауки России, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, 1 публикация в сборнике материалов всероссийской научной конференции.

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа оформлена в соответствие с Национальным стандартом Российской Федерации ГОСТ Р 7.0.11-2011, изложена на 118 листах машинописного текста, состоит из введения, 4 глав, заключения, выводов,

практической значимости, списка сокращений и условных обозначений, списка литературы и 1 приложения. Список литературы включает 209 работ, из них 54 источников на русском языке и 155 зарубежных источника. Текст иллюстрирован 8 таблицами и 26 рисунками.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Исследования проводились на мышах линии C57Bl/6Y, в возрасте около 2,5 мес., с начальной средней массой $20 \pm 2,0$ г. в ФГБУН НЦБМТ ФМБА России. Все эксперименты были одобрены биоэтической комиссией ФГБУН НЦБМТ ФМБА России и проводились с соблюдением требований стандартных операционных процедур (СОП) ФГБУН НЦБМТ ФМБА России, руководств и Национальных стандартов. Острое воспалительное повреждение легких у мышей C57Bl/6Y моделировали последовательным введением α -GalCer, ингаляционно в дозе 1 мкг/мышь, и через 24 ч – комбинации липополисахарида *E. coli* 055:B5 в дозе 300 мкг/мышь с добавлением 100 мкг/мышь мурамилпептида и 10 мкл/мышь полного адьюванта Фрейнда (здесь и далее обозначаемой как LPS) интратрахеально под инъекционным наркозом, состоящим из комбинации препаратов – Золетил 100 («Virbac», Франция) и Медитамидин («Api-San», Россия) в дозе 12,5 мг/кг и 1 мг/кг соответственно. Сразу после проведения хирургической манипуляции вводился Антиседан («Orion Pharma», Финляндия) подкожно в дозе 2,5 мг/кг.

Ингаляционное введение растворов препаратов в форме аэрозоля проводилось с использованием компрессорного ингалятора с заданными характеристиками (средний размер частиц 3 мкм, производительность 0,3 мл/мин), снабженного разработанной в настоящем исследовании насадкой на ингалятор, позволяющей проводить ингаляцию одномоментно нескольким животным с равной дозовой нагрузкой. Определение концентраций гексапептида YdAGFLR в биологических образцах выполняли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрией высокого разрешения с применением времяпролетного масс-детектора (ВЭЖХ-МС ВР) на хроматографе жидкостном

Agilent 1260, оснащённом автодозатором, с масс-селективным детектором Agilent 6545XT Accurate mass Q-TOF LC/MS. Для анализируемого гексапептида YdAGFLR диагностическое массовое число родительского иона $(M+2H)^{2+}$ составляло $363,69 \pm 0,005$, а время удерживания – $20,3 \pm 0,05$ мин. Уровни мРНК сиртуинов 1-7, IL-1 β , TNF- α , IL-6 в исследуемых пробах определяли с помощью амплификатора CFX-96 («Bio-Rad», США) с использованием специфических праймеров и флуоресцентных зондов. Уровни белков цитокинов определяли в образцах БАЛ. Измерения проводились на мультиплексном ридере Bio-Plex $\text{®MAGPIX}^{\text{TM}}$ Multiplex Reader («Bio-Rad» SN: 12250707) с использованием стандартной коммерчески доступной панели (Bio-Plex Pro $^{\text{TM}}$ Mouse Cytokine Th17 Panel A 6-Plex #M6000007NY) в соответствии с протоколом производителя. Анализ полученных данных проводился в программе BioPlex Data Pro (версия 1.0.0.06) фирмы «Bio-Rad» (США). Данные представлены как среднее $\pm$ стандартная ошибка среднего с использованием следующих обозначений: M — среднее, m — стандартная ошибка среднего, SD — стандартное отклонение, n — объём выборки, p — достигнутый уровень значимости. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$. Для выбора параметрических или непараметрических методов статистического анализа использовали критерии Колмогорова-Смирнова или Шапиро-Уилка. Статистический анализ данных проводили с помощью непарного двустороннего *t*-теста Стьюдента, непараметрического U-критерия Манна-Уитни, однофакторного дисперсионного анализа (one-way ANOVA) или двухфакторного дисперсионного анализа (two-way ANOVA) с использованием программного обеспечения GraphPadPrism v.8.3.0 (San Diego, США). Для множественных сравнений использовали тесты Даннетта или Сидака.

РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Валидация ингаляционного способа введения гексапептида YdAGFLR с использованием аэрозольной камеры

Для того, чтобы подтвердить, что ингаляционное введение гексапептида YdAGFLR с использованием разработанной аэрозольной камеры обеспечивает

заявленный терапевтический эффект - повышение транскрипции гена *SIRT1* в легких с индуцированным острым воспалением, мышам вводили однократно гексапептид (n=6) или физ. раствор (n=6) и определяли уровни мРНК *SIRT1*. Гексапептид многократно повысил экспрессию мРНК SIRT1 в легких (p<0,05) по сравнению с контролем (рисунок 1).

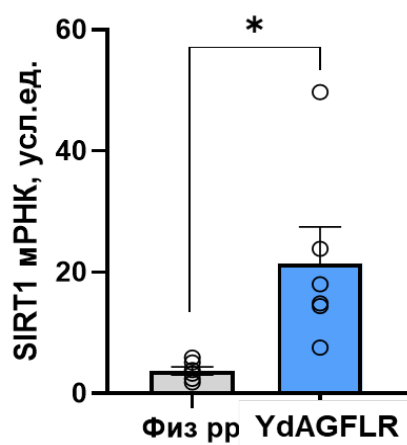


Рисунок 1 - Эффект ингаляционного введения гексапептида YdAGFLR на уровни мРНК *SIRT1* в легких мышей C57BL/6Y с острым воспалением легких; * - (p<0,05; непарный двусторонний *t*-тест Стьюдента)

Для изучения распределение гексапептида YdAGFLR в легких и сыворотке крови, гексапептид вводился ингаляционно однократно (рисунок 2).

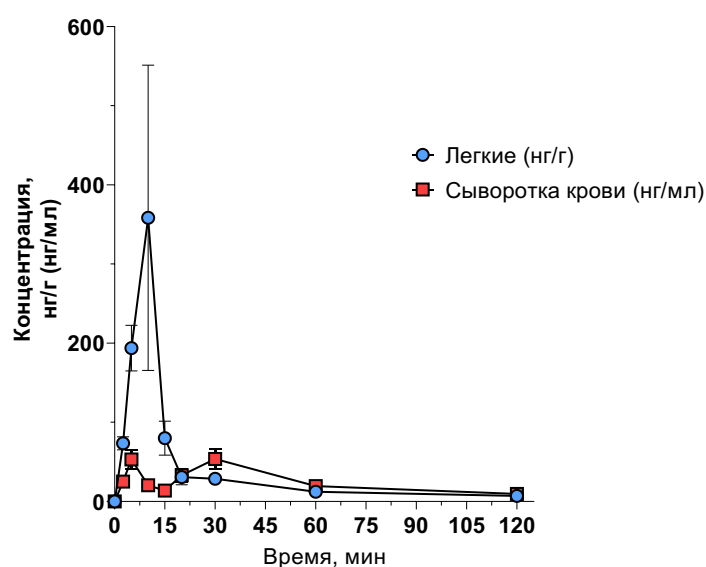


Рисунок 2 - Динамика изменений концентраций гексапептида YdAGFLR в легких (●) и сыворотке крови (■) после однократного ингаляционного введения мышам C57Bl/6Y (n=6) в дозе 150 мг/кг

Основные фармакокинетические параметры распределения гексапептида YdAGFLR в ткани легкого и сыворотке крови при однократном ингаляционном введении с использованием аэрозольной камеры показаны в таблице 1.

Таблица 1 - Фармакокинетические параметры гексапептида YdAGFLR в сыворотке крови и легких после однократного ингаляционного введения в дозе 150 мг/кг

Параметр	Размерность	Сыворотка крови	Ткань легкого
$C_{\max}$	нг/мл/г	53,8	358,5
$T_{\max}$	мин	30,0	10,0
$t_{1/2el}$	мин	38,9	25,8
MRT	мин	62,4	27,7
$AUC_{0 \rightarrow t}$	нг/мл (г) × мин	2919,8	4665,5
$AUC_{0 \rightarrow \infty}$	нг/мл (г) × мин	3403,5	4831,3
$C_{\max}/AUC_{0 \rightarrow t}$	мин ⁻¹	0,018	0,077
$C_{\max}/AUC_{0 \rightarrow \infty}$	мин ⁻¹	0,016	0,074

Примечание: $C_{\max}$ — максимальная концентрация; $T_{\max}$ — время достижения максимальной концентрации; $t_{1/2el}$ — период, за который выводится половина введенной и всосавшейся дозы; MRT — среднее время удержания; AUC — площадь под фармакокинетической кривой

Исследование влияния пептидов YdAGFLR и YdAGFLRR-NH₂ на транскрипцию генов сиртуинов 1-7 в легких мышей C57Bl/6Y в условиях острого воспаления

Согласно анализу ПЦР в реальном времени, транскриптом сиртуинов в легких здоровых интактных мышей C57Bl/6Y представлен преимущественно двумя ядерными сиртуинами SIRT1 и SIRT6 (рисунок 3).

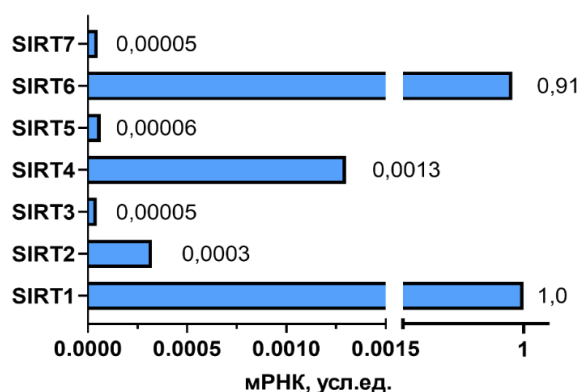


Рисунок 3 - Среднее содержание мРНК сиртуинов 1-7 в легких интактных мышей C57Bl/6Y (n=3) по данным анализа ПЦР в реальном времени. Уровень мРНК SIRT1 принят за 1,0

Эффекты однократного ингаляционного введения YdAGFLR и YdAGFLRR-NH₂ на транскрипцию сиртуинов 1 – 7 в легких мышей с острым воспалением легких по сравнению с физ. раствором даны на рисунках 4 и 5, соответственно.

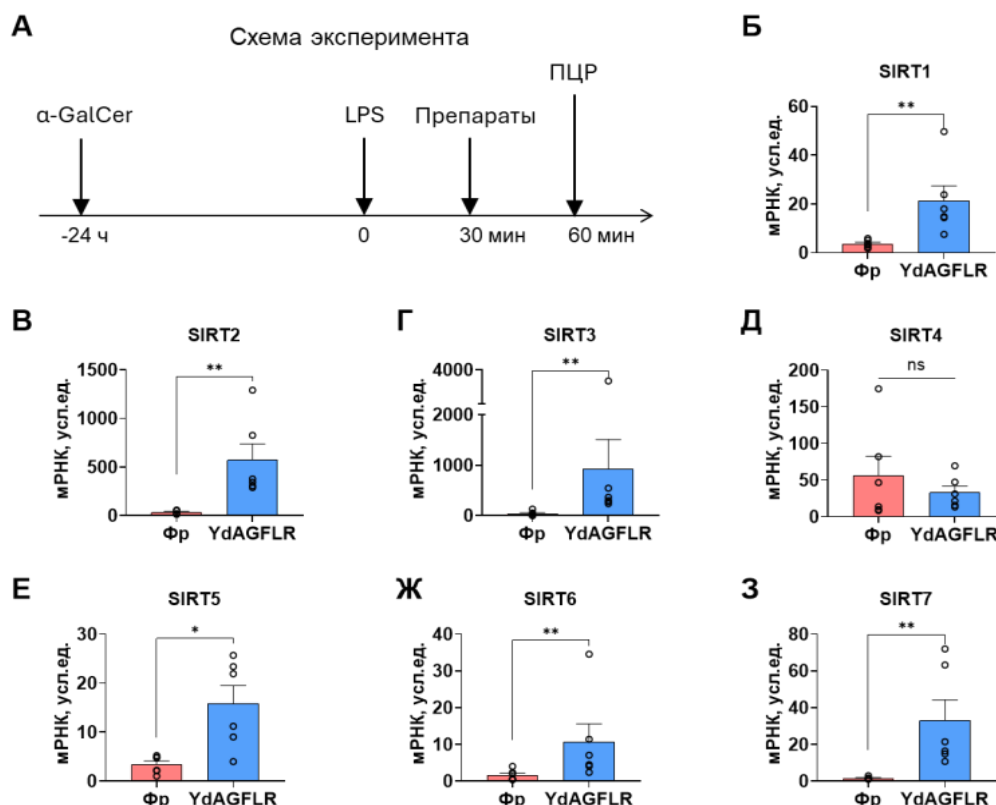


Рисунок 4 - Эффект гексапептида YdAGFLR на транскрипцию SIRT1 (Б), SIRT2 (В), SIRT3 (Г), SIRT4 (Д), SIRT5 (Е), SIRT6 (Ж) и SIRT7 (З) в легких мышей C57Bl/6Y с острым воспалением легких. Схема эксперимента (А). За одну усл. ед. принято среднее значение уровней мРНК соответствующих сиртуинов у интактных животных. $M \pm m$ ($n=6$). ns— $p>0,05$; *— $p<0,05$; **— $p<0,01$ по сравнению с физ. раствором (тест Манна-Уитни)

Ингаляционное введение гексапептида YdAGFLR мышам с острым воспалением легких вызывает статистически значимое повышение уровней мРНК SIRT1 в 5,7 раза ($p<0,01$; рисунок 4Б), SIRT2 в 16 раз ($p<0,01$; рисунок 4В), SIRT3 в 23 раза ($p<0,01$; рисунок 4Г), SIRT5 в 4,7 раза ($p<0,01$; рисунок 4Е), SIRT6 в 6,4 раза ($p<0,01$; рисунок 4Ж) и SIRT7 в 19,9 раза ($p<0,01$; рисунок 4З), но не SIRT4 ($p=0,937$; рисунок 4Д), по сравнению с соответствующими уровнями мРНК в контроле.

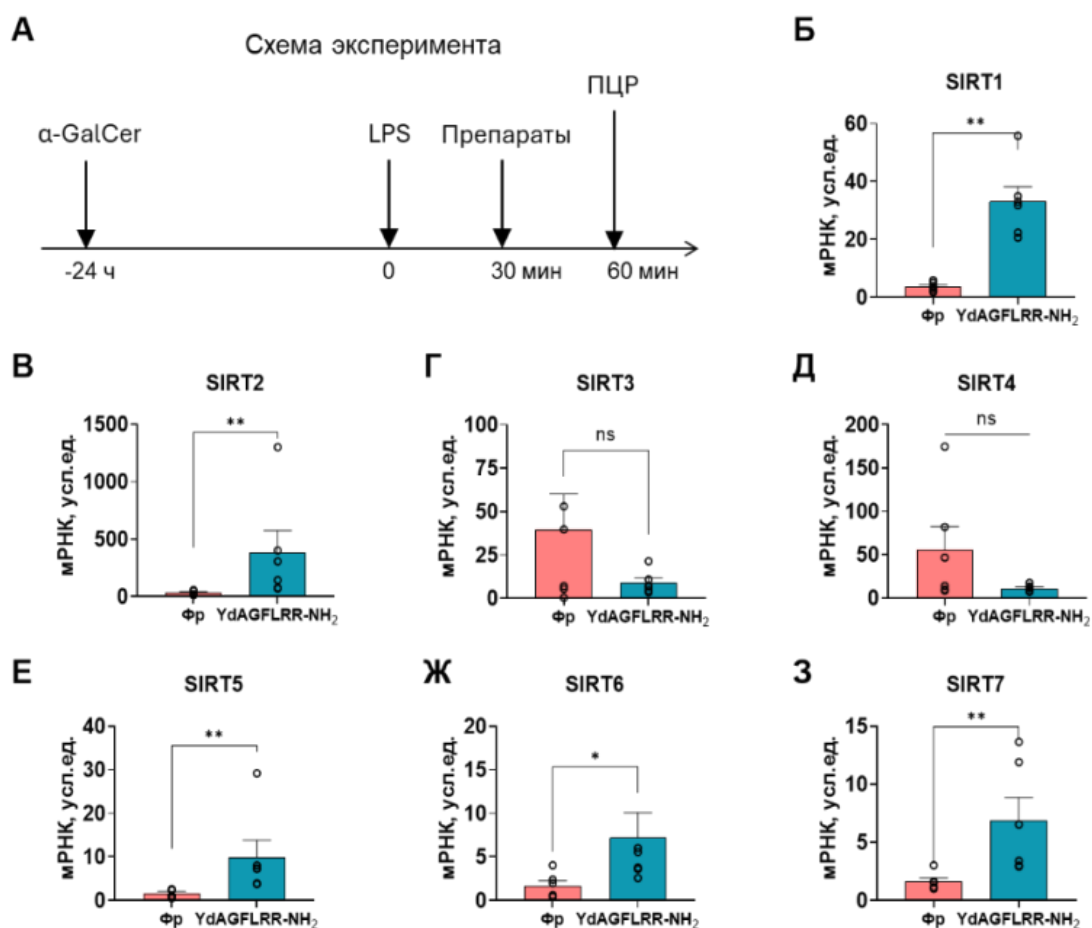


Рисунок 5 - Эффект гептапептида YdAGFLRR-NH₂ на транскрипцию SIRT1 (Б), SIRT2 (В), SIRT3 (Г), SIRT4 (Д), SIRT5 (Е), SIRT6 (Ж) и SIRT7 (З) в легких мышей C57Bl/6Y с острым воспалением легких. Схема эксперимента (А). За одну усл. ед. принято среднее значение уровней мРНК соответствующих сиртуинов у интактных животных. $M \pm m$ ($n=6$). ns- $p>0,05$; *- $p<0,05$; **- $p<0,01$ по сравнению с физ. раствором (тест Манна-Уитни)

Ингаляционное введение гептапептида YdAGFLRR-NH₂ мышам с острым воспалением легких вызывает статистически значимое повышение в легких уровней мРНК SIRT1 в 9,1 раза ($p<0,01$; рисунок 5Б), SIRT2 в 6,1 раза ($p<0,01$; рисунок 5В), SIRT5 в 4,2 раза ($p<0,01$; рисунок 5Е), SIRT6 в 3,6 раза ($p<0,05$; рисунок 5Ж) и SIRT7 в 3,2 раза ($p<0,01$; рисунок 5З), но не SIRT3 ($p=0,4848$; рисунок 15Г) и SIRT4 ($p=0,093$; рисунок 5Д), по сравнению с соответствующими уровнями мРНК у контрольных животных, получавших ингаляционно физ. раствор.

Исследование влияния гексапептида YdAGFLR на динамику изменения уровней мРНК SIRT1, IL-1 β , TNF- α и IL-6 в легких мышей C57Bl/6Y в условиях острого воспаления

Для того, чтобы уточнить взаимосвязь SIRT1 и основных провоспалительных цитокинов IL-1 β , TNF- α , IL-6 мышам C57Bl/6Y индуцировали воспаление легких и изучали динамику изменений уровней мРНК IL-1 β , TNF- α , IL-6 и SIRT1 в течение 72 часов (Рисунок 6).

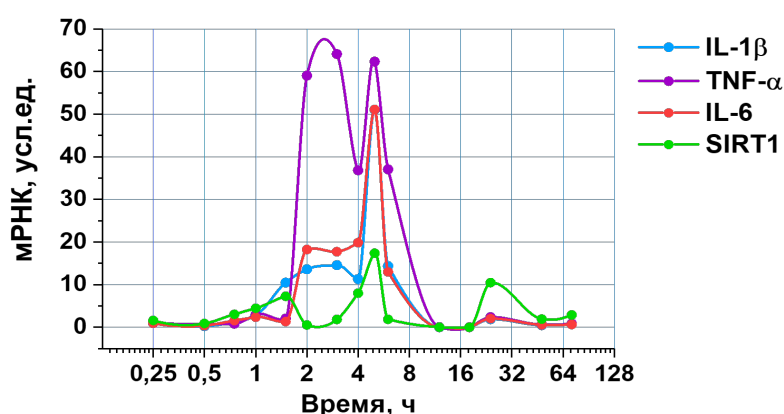


Рисунок 6 - Профили мРНК IL-1 β , TNF- α , IL-6 и SIRT1 в тканях легких мышей C57BL/6Y с острым воспалением легких, индуцированным LPS, в интервале 0,25-72 ч. Примечание: символы — среднее (n=5) экспериментальных значений в указанных временных точках; линии — интерполяция сплайнами Акима. Одна усл. ед. — средний уровень мРНК у интактных животных

Введение LPS вызывает осцилляции уровней мРНК цитокинов и SIRT1 в легких в течение следующих 72 ч. Однофакторный дисперсионный анализ (one-way ANOVA) выявил статистически значимые изменения уровней мРНК IL-1 β ($F_{14,60}=10,25$; $p<0,0001$), TNF- α ($F_{14,60}=19,55$; $p<0,0001$), IL-6 ($F_{14,60}=10,19$; $p<0,0001$) и SIRT1 ($F_{14,60}=8,180$; $p<0,0001$) в интервале 0,25 – 72 ч, а апостериорный тест Даннетта показал наличие статистически значимого синхронного 50- и 60-кратного пикового повышения уровней мРНК IL-1 β ($p<0,0001$), IL-6 ($p<0,0001$), TNF- α ($p<0,0001$) и 17-кратного повышения мРНК SIRT1 ($p<0,0001$) во временной точке 5 часов относительно соответствующих исходных значений (временная точка 0,25 ч). Статистически значимое 10-кратное повышение уровней мРНК SIRT1 во временной точке 24 ч ($p<0,01$), когда осцилляции цитокинов уже затухают,

полностью согласуется с гипотезой о роли SIRT1 как фактора отрицательной обратной связи в регуляции воспаления. Эффекты однократного ингаляционного введения гексапептида YdAGFLR на профили мРНК SIRT1, IL-1 β , TNF- α и IL-6 показаны на Рисунке 7.

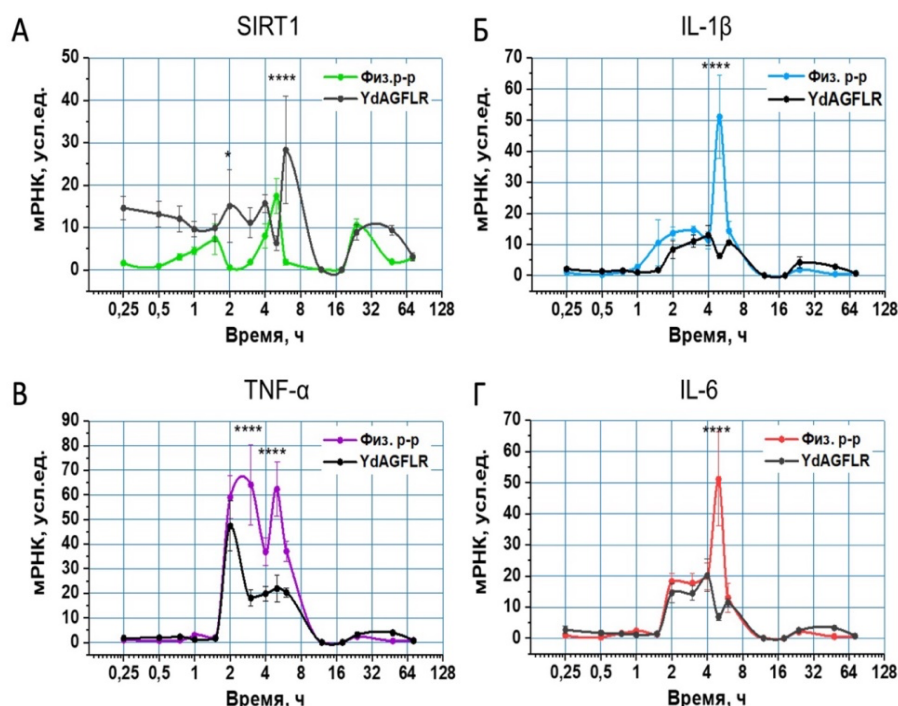


Рисунок 7 - Эффекты однократного ингаляционного введения YdAGFLR на уровни мРНК SIRT1 (А), IL-1 β (Б), TNF- α (В) и IL-6 (Г) в легких мышей C57BL/6Y с острым воспалением легких, индуцированным LPS, в интервале 0,25-72 ч. Символы — $M \pm m$ ($n=5$) значений в указанных временных точках; линии — интерполяция сплайнами Акима; * — $p < 0,05$, **** — $p < 0,0001$ по сравнению с контролем (физ. р-р)

Двухфакторный дисперсионный анализ (two-way ANOVA) выявил статистически значимый основной эффект YdAGFLR на уровни мРНК IL-1 β ($F_{1,120}=12,30$; $p < 0,001$), TNF- α ($F_{1,120}=24,00$; $p < 0,0001$), IL-6 ($F_{1,120}=6,688$; $p < 0,01$) и SIRT1 ($F_{1,120}=27,41$; $p < 0,0001$), а также основной эффект фактора времени на указанные профили мРНК ($p < 0,001$). Апостериорный тест Сидака показал, что гексапептид YdAGFLR статистически значимо повышал экспрессию мРНК SIRT1 во временных точках 2 ($p < 0,05$) и 6 часов ($p < 0,0001$), снижая при этом пиковые амплитуды мРНК провоспалительных цитокинов IL-1 β ($p < 0,0001$), TNF- α ($p < 0,0001$) и IL-6 ($p < 0,0001$) во временной точке 5 часов по сравнению с соответствующими контролями. Сравнение площадей под кривыми показывает, что

YdAGFLR повышает транскрипцию SIRT1 в 2,5 раза ($p < 0,0001$), снижая при этом транскрипцию IL-1 β ($p < 0,001$), TNF- α ($p < 0,0001$) и IL-6 ($p < 0,01$) в 1,6 – 1,9 раза по сравнению с соответствующими контролями.

Исследование влияния гексапептида YdAGFLR на динамику изменения уровней цитокинов IL-1 β , TNF- α и IL-6 в бронхоальвеолярном лаваже из легких мышей C57Bl/6Y в условиях острого воспаления

Для оценки влияния ингаляционного введения YdAGFLR на уровни провоспалительных цитокинов IL-1 β , TNF- α и IL-6 в легких мышей C57Bl/6Y с острым воспалением легких, пробы бронхоальвеолярного лаважа отбирались и проводились измерения уровней цитокинов в раннем (0,25 – 6 ч) и позднем периоде (18 – 72 ч) воспаления (рисунок 8).

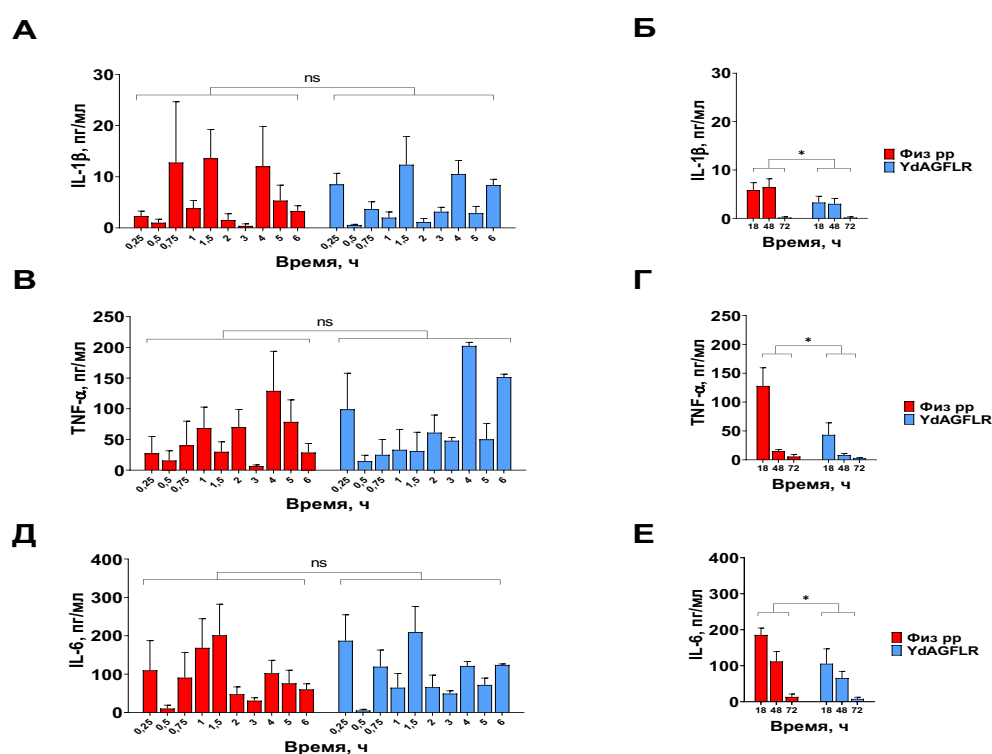


Рисунок 8 - Эффекты однократного ингаляционного введения YdAGFLR на уровни IL-1 β (А, Б), TNF- α (В, Г), IL-6 (Д, Е) в бронхоальвеолярном лаваже из легких мышей C57BL/6Y с острым воспалением легких в интервале 0,25 – 6 ($n=9$) (А, В, Д) и 18 – 72 ч ($n=18$) (Б, Г, Е) по сравнению с контролем (физ. раствор); ns— $p > 0,05$, *— $p < 0,05$

В раннем периоде наблюдений 0,25 – 6 ч, двухфакторный дисперсионный анализ (two-way ANOVA) не выявил статистически значимого основного эффекта

гексапептида YdAGFLR на концентрации цитокина IL-1 β ($F_{1,40}=0,0308$; $p=0,8615$; рисунок 8А), TNF- α ($F_{1,40}=2,686$; $p=0,1091$; рисунок 8В) и IL-6 ($F_{9,40}=3,220$; $p=0,0050$; рисунок 8Д) по сравнению с контролем, но выявил статистически значимый основной эффект времени измерений, что указывает на выраженные колебания уровней цитокинов в этот период. В позднем периоде наблюдений в период 18 – 72 ч, двухфакторный дисперсионный анализ (two-way ANOVA) выявил статистически значимый основной эффект гексапептида YdAGFLR на уровни IL-1 β ($F_{1,30}=4,246$; $p=0,0481$; рисунок 8Б), TNF- α ($F_{1,29}=7,441$; $p=0,0107$; рисунок 8Г) и ($F_{1,30}=5,293$; $p=0,0285$; рисунок 8Е), а также статистически значимый основной эффект времени измерений, что указывает на колебания уровней цитокинов в этот период. В целом, основное антицитокиновое действие гексапептида YdAGFLR реализуется на поздней стадии разрешения воспаления.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В результате проведенных в данной работе исследований впервые было показано, что синтетические производные динарфина YdAGFLR и YdAGFLRR-NH₂ обладают общим механизмом противовоспалительного действия, который включает повышение транскрипции сиртуинов SIRT1, SIRT2 и SIRT6, а не только SIRT1, как было установлено ранее (Karkischenko et al., 2021). Ядерный SIRT1 (Yeung et al., 2004) и цитозольный SIRT2 (Rothgiesser et al., 2010) деацетилируют субъединицу p65 гетеродимера NF- κ B и снижают его транскрипционную активность. SIRT6, деацетилируя гистон H3 (K⁹), препятствуя связыванию субъединицы p65 фактора NF- κ B с промотором целевого гена (Kawahara et al., 2009). Ген сиртуина 1 является одним из целевых генов NF- κ B (Katto et al., 2013), экспрессия которого в условиях воспаления, согласно гипотезе (Kauppinen et al., 2013), формирует регуляторную обратную отрицательную связь, где NF- κ B индуцирует экспрессию SIRT1, который в свою очередь деацетилирует и инактивирует NF- κ B, что должно приводить к затухающим осцилляциям уровней мРНК целевых генов NF- κ B с последующим разрешением воспаления. Моделирование острого воспаления легких введением LPS запускает осцилляции

мРНК IL-1 β , TNF- α , IL-6 и SIRT1, известных целевых генов NF- κ B, в легких, с постепенным затуханием в течение 72 ч. Введение YdAGFLR меняет характер осцилляций, повышая уровни мРНК SIRT1 и снижая уровни мРНК IL-1 β , TNF- α и IL-6, что ведет к усилению отрицательной обратной связи, ограничивающей транскрипцию провоспалительных цитокинов и разрешению воспаления. Это подтверждают результаты изучения динамики уровней цитокинов IL-1 β , TNF- α и IL-6 в бронхоальвеолярном лаваже, где гексапептид YdAGFLR статистически снижал концентрации этих цитокинов в поздней фазе воспаления (период 18 – 72 ч). С учетом сведений из литературы и результатов собственных исследований можно составить схему противовоспалительного действия синтетических производных динарфина на примере гексапептида YdAGFLR. (рисунок 9).

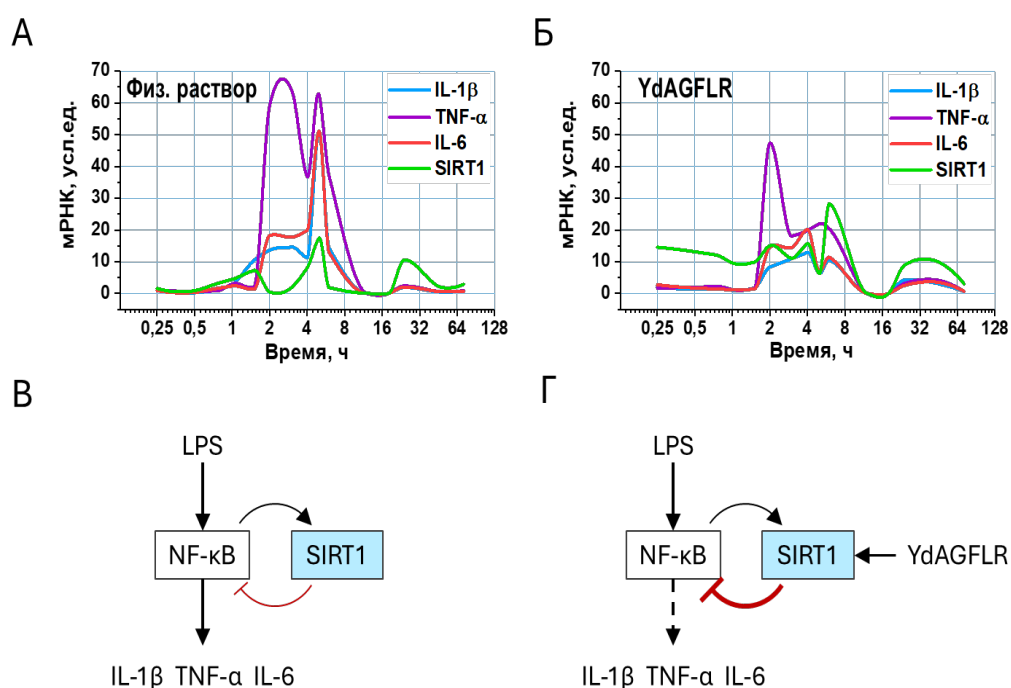


Рисунок 9 – Схема противовоспалительного действия гексапептида YdAGFLR при ингаляционном введении на модели острого воспаления легких. LPS вызывает повышение уровней мРНК IL-1 β , IL-6, TNF- α и SIRT1 в форме синхронных осцилляций (А), вызванных взаимодействием NF- κ B и SIRT1, где SIRT1 играет роль фактора обратной отрицательной связи, снижающей транскрипционную активность NF- κ B и ограничивающей воспаление (В). YdAGFLR снижает уровни мРНК IL-1 β , IL-6 и TNF- α и повышает уровни мРНК SIRT1 (Б), что ведет к усилению обратной отрицательной связи с участием SIRT1, снижению транскрипции провоспалительных цитокинов и разрешению воспаления (Г)

ВЫВОДЫ

1. Разработана аэрозольная камера на базе компрессорного ингалятора, позволяющая проводить ингаляции пептидными препаратами одномоментно нескольким животным с равной дозовой нагрузкой благодаря расположению фиксаторов на одинаковом расстоянии от источника подачи аэрозоля.

2. Валидирован способ ингаляционного введения синтетического производного динорфина YdAGFLR мышам с использованием аэрозольной камеры, обеспечивающий доставку препарата в легкие с фармакокинетическими параметрами $T_{\max}$ 10,0 мин, $t_{1/2el}$ 25,8 мин и MRT 27,7 мин и обеспечивающий заявленный терапевтический эффект, а именно повышение уровня транскрипции мРНК SIRT1 на фоне введения производного динорфина YdAGFLR в модели острого воспаления легких у мышей C57Bl/6Y, индуцированной последовательным введением α -галактоцерамида, стимулятора инвариантных естественных киллерных Т-клеток, и липополисахарида *E. coli*, агониста TLR4.

3. Впервые показано, что синтетическое производное динорфина YdAGFLR при ингаляционном введении повышает не только транскрипцию гена SIRT1, но также транскрипцию генов сиртуинов SIRT2, SIRT3, SIRT5, SIRT6 и SIRT7, но не сиртуина SIRT4, в легких мышей C57Bl/6Y с острым воспалением легких по сравнению с контролем.

4. Впервые показано, что синтетическое производное динорфина YdAGFLRR-NH₂ при ингаляционном введении повышает транскрипцию генов сиртуинов SIRT1, SIRT2, SIRT5, SIRT6 и SIRT7, но не сиртуинов SIRT3 и SIRT4, в легких мышей C57Bl/6Y с острым воспалением легких по сравнению с контролем.

5. Обнаружено и описано, что индукция острого воспаления легких у мышей C57Bl/6Y вызывает периодические колебания (осцилляции) уровней мРНК провоспалительных цитокинов IL-1 β , IL-6 и TNF- α и сиртуина SIRT1 в легких.

6. Установлено, что в ранней фазе развития воспаления преобладают мРНК цитокинов IL-1 β , IL-6 и TNF- α , тогда как в поздней фазе, соответствующей стадии разрешения воспаления преобладает мРНК SIRT1, что согласуется с гипотезой о

том, что SIRT1 может являться фактором отрицательной обратной связи в транскрипции провоспалительных цитокинов и фактором разрешения воспаления.

7. Показано, что гексапептид YdAGFLR при ингаляционном введении мышам C57Bl/6Y с острым воспалением легких не влияет на периодичность осцилляций, но статистически значимо снижает амплитуды колебаний мРНК провоспалительных цитокинов IL-1 β , TNF- α и IL-6 в 1,9; 1,9 и 1,6 раза, соответственно, повышая при этом амплитуду осцилляций мРНК SIRT1 в 2,5 раза по сравнению с соответствующими контролями.

8. Доказано, что синтетическое производное динарфина YdAGFLR при ингаляционном введении снижает уровень экспрессии провоспалительных цитокинов IL-1 β , IL-6 и TNF- α в бронхолегочном лаваже у мышей линии C57Bl/6Y с острым воспалением легких в поздней фазе воспаления 18 – 72 часа, соответствующей стадии разрешения воспаления.

9. Установлено, что синтетическое производное динарфина YdAGFLR при ингаляционном введении не подавляет экспрессию этих же цитокинов в ранней фазе воспаления, тем самым не вызывая иммуносупрессию, что указывает на отличительную особенность противовоспалительного действия производных динарфина, а именно способность положительно влиять на разрешение воспаления без подавления собственных иммунных реакций организма.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Результаты исследования механизма антицитокинового действия YdAGFLR, синтетического производного динарфина 1-6, имеющего непатентованное международное название «тирозил-D-аланил-глицил-фенилаланил-лейцил аргинина ацетат», на биомодели острого воспаления легких и ОРДС, как часть регистрационного досье и обоснование механизма противовоспалительного действия лекарственного препарата Лейтрагин при COVID-19, внедрены в разработку оригинального препарата Лейтрагин для лечения COVID-19, раствор для ингаляций, действующее вещество «тирозил-D-аланил-глицил-фенилаланил

лейцил-аргинина ацетат» 1 мг/мл, регистрационное удостоверение №: ЛП-007043, держатель РУ ФГБУН НЦБМТ ФМБА России.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Ингаляционное введение препарата Лейтрагин мышам линии C57BL/6Y в модели ОРДС повышает уровень экспрессии гена SIRT1 / **Огнева Н.С.**, Таболякова Л.А., Алимкина О.В., Петрова Н.В. // **Биомедицина.** – 2023. – Т. 19. - № 3. – С. 36-41.
2. Сравнительное изучение фармакокинетики пептидного препарата «Лейтрагин» в сыворотке крови и ткани лёгкого мышей линии C57BL/6Y после однократного ингаляционного введения / **Огнева Н.С.**, Нестеров М.С., Хвостов Д.В., Фокин Ю.В., Каркищенко В.Н. // **Биомедицина.** – 2024. – Т. 20. - № 1. - С. 21-32.
3. Эпигенетические механизмы противовоспалительного действия опиоидного пептида Лейтрагин: роль сиртуина 1 / Помыткин И.А., **Огнева Н.С.**, Фокин Ю.В., Петрова Н.В., Алимкина О.В., Каркищенко В.Н. // **Биомедицина.** – 2024. – Т. 20. - №3. – С. 10-20.
4. Лейтрагин повышает транскрипцию гена *Сиртуин 6* в условиях острого воспаления легких у мышей / Помыткин И.А., **Огнева Н.С.**, Петрова Н.В., Фокин Ю.В., Слободенюк В.В., Леднева Н.А., Каркищенко В.Н. // **Биомедицина.** - 2025. - Т. 21. - № 1. - С. 8-17.
5. Биомоделирование острого воспаления легких и острого респираторного дистресс-синдрома на мышцах линии C57BL/6Y: эффект Лейтрагина на транскрипцию сиртуинов и провоспалительных цитокинов / **Огнева Н.С.**, Петрова Н.В., Нестеров М.С., Леднева Н.А., Алимкина О.В., Фокин Ю.В., Помыткин И.А., Каркищенко В.Н. // **Ключевые точки оптимизации скорой, экстренной и неотложной медицинской помощи в РФ: Материалы 7-го съезда врачей неотложной медицины (Москва, 18-19 сентября 2025 г.)** - Москва: НПО ВНМ, НИИ СП им. Н.В. Склифосовского ДЗМ, 2025. - Труды института, Т. 266. - 167 с.

6. Мультицелестное противовоспалительное действие опиоидного пептида Лейтрагин / **Огнева Н.С.**, Нестеров М.С., Фокин Ю.В., Хвостов Д.В., Левашова А.И., Каркищенко В.Н. // **Биомедицина**. - 2026. - Т. 22. - №1. - С. 10-14.

7. Эффекты гептапептида [D-Ala²]-Динорфин(1-7)Амида на транскрипцию сиртуинов в условиях острого воспаления в легких у мышей C57BL/6Y / Помяткин И. А., **Огнева Н.С.**, Петрова Н.В., Фокин Ю.В., Алимкина О.В., Каркищенко В.Н., Огнева А.С. // **Биомедицина**. - 2026. - Т. 22. - №1. - С. 15-24.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

YdAGFLR	– тирозил-D-аланил-глицил-фенилаланил-лейцил-аргинина диацетат
YdAGFLRR-NH ₂	– амид тирозил-D-аланил-глицил-фенилаланил-лейцил- аргинил-аргинина
ВОЗ	– Всемирная организация здравоохранения
COVID-19	– коронавирусная инфекция 2019 г.
ОРДС	– острый респираторный дистресс-синдром
ГКС	– глюкокортикостероиды
HMGB1	– белок бокс 1 группы высокой подвижности
мРНК	– матричная рибонуклеиновая кислота
IL-1β	– интерлейкин-1 бета
TNF-α	– фактор некроза опухоли альфа
IL-6	– интерлейкин-6
ПЦР	– полимеразная цепная реакция
LPS	– липополисахарид <i>E. coli</i>
TLR4	– Toll-подобный рецептор 4
БАЛ	– бронхоальвеолярный лаваж
α-GalCer	– альфа-галактоцерамид
ВЭЖХ-МС ВР	– высокоэффективная жидкостная хроматография с масс- спектрометрией высокого разрешения
NF-κB	– ядерный фактор каппа-би