

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
«НАУЧНЫЙ ЦЕНТР БИОМЕДИЦИНСКИХ ТЕХНОЛОГИЙ ФЕДЕРАЛЬНОГО
МЕДИКО-БИОЛОГИЧЕСКОГО АГЕНТСТВА»

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

Диссертация
на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Научный руководитель:
Доктор медицинских наук, профессор
Каркищенко Владислав Николаевич

Москва – 2026

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	12
1.1. Семейство динорфинов.....	12
1.2. Синтетические производные динорфинов.....	15
1.3. Динорфины и их синтетические аналоги в регуляции воспаления.....	17
1.4. Роль сиртуинов в регуляции воспаления.....	20
1.5. Ядерный фактор NF-κB в регуляции воспаления в легких.....	24
1.6. Взаимодействие NF-κB и сиртуинов в разрешении воспаления.....	29
1.7. Фармакологические активаторы сиртуинов.....	34
1.8. Выводы по главе 1.....	36
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	38
2.1. Материалы.....	38
2.2. Животные.....	38
2.3. Методы исследований.....	40
2.3.1. Моделирование острого воспаления легких у мышей C57Bl/6Y.....	40
2.3.2. Ингаляционная система.....	41
2.3.3. Измерение концентраций гексапептида YdAGFLRY в крови и легких мышей C57Bl/6Y методом ВЭЖХ-МС.....	42
2.3.4. Изучение экспрессии генов сиртуинов 1-7 в легких мышей C57Bl/6Y методом ПЦР в реальном времени.....	44
2.3.5. Изучение динамики транскрипции генов в легких мышей C57Bl/6Y с острым воспалением легких после однократного ингаляционного введения гексапептида YdAGFLR методом ПЦР в реальном времени.....	46
2.3.6. Анализ цитокинов IL-1β, IL-6 и TNF-α в бронхоальвеолярном лаваже из легких мышей C57Bl/6Y с острым воспалением легких после однократного ингаляционного введения гексапептида YdAGFLR.....	47
2.4. Статистический анализ.....	48
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ.....	50

3.1. Валидация ингаляционного способа введения с использованием аэрозольной камеры	50
3.1.1. Валидация ингаляционного способа введения гексапептида YdAGFLR с использованием аэрозольной камеры.....	50
3.1.2. Изучение распределения гексапептида YdAGFLR в легких и крови мышей C57BL/6Y после однократного ингаляционного введения с использованием аэрозольной камеры.....	52
3.2. Исследование влияния пептидов YdAGFLR и YdAGFLRR-NH ₂ на транскрипцию генов сиртуинов 1-7 в легких мышей C57Bl/6Y в условиях острого воспаления.....	55
3.2.1. Исследование транскрипции сиртуинов 1-7 в легких интактных мышей C57Bl/6Y	55
3.2.2. Исследование влияния гексапептида YdAGFLR на транскрипцию сиртуинов 1-7 в легких мышей C57Bl/6Y в условиях острого воспаления.....	57
3.2.3. Исследование влияния гептапептида YdAGFLRR-NH ₂ на транскрипцию сиртуинов 1-7 в легких мышей C57Bl/6Y в условиях острого воспаления.....	59
3.3. 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	60
3.4. 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	68
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ	73
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	87
ВЫВОДЫ	89
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ	91
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	92
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	95
ПРИЛОЖЕНИЕ А.....	118

ВВЕДЕНИЕ

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) [1]. 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 [2].

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 [3, 4]. 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 [5]. Ключевым звеном в патогенезе повреждения легочной ткани при пневмонии является избыточная и неконтролируемая воспалительная реакция, которая ведет к острому повреждению легких (ОРДС) и дыхательной недостаточности. Опыт, полученный в ходе пандемии COVID-19, показал необходимость противовоспалительной терапии в дополнение к антибактериальной и противовирусной [6]. 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 [7, 8], 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 [9]. 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 [10-14] и синтетических производных

лейэнкефалина [15, 16]. Основные данные о противовоспалительном механизме действия динорфинов получены при исследовании синтетического гексапептида Tyr-D-Ala-Gly-Phe-Leu-Arg. Показано, что действие этого пептида связана с его опиоидной активностью и способностью активировать транскрипцию гистоновой деацетилазы сиртуин 1 (SIRT1), которая влияет на сигнальные пути, связанные с секрецией провоспалительного белка бокс 1 группы белков высокой подвижности (HMGB1) [17] и транскрипцией провоспалительных цитокинов [18]. Неизвестно, однако, может ли выявленный индивидуальный эффект гексапептида экстраполироваться на другие производные динорфина. Неизвестно, влияет ли гексапептид Tyr-D-Ala-Gly-Phe-Leu-Arg и другие производные динорфина 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 противовоспалительно 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 динорфина 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 динорфина. Впервые показано, что известный эффект YdAGFLR на транскрипцию SIRT1 не является изолированным эффектом только этого соединения, но характерен и для других производных динорфина. 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 динорфина могут снижать амплитуды осцилляций мРНК провоспалительных цитокинов, одновременно повышая транскрипцию SIRT1. Впервые показано на примере YdAGFLR, что производные динорфина 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 динорфина, 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 научной 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 соответствии с Национальным стандартом Российской Федерации ГОСТ Р7.0.11-2011, 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 источника на русском языке и 155 зарубежных источников. Текст иллюстрирован 8 таблицами и 26 рисунками.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Семейство динорфинов

Динорфины (DYN) – семейство регуляторных эндогенных опиоидных пептидов, образующихся из биологически неактивного предшественника продинорфина, кодируемого геном *PDYN* [19]. Продинорфин человека представляет собой белок с последовательностью из 254 аминокислот, который в организме подвергается расщеплению пептидазами и протеазами с образованием биологически активных пептидов, а именно большого динорфина А (DYN А 1-32), динорфина А 1-17 (DYN А 1-17), динорфина А 1-13 (DYN А 1-13), динорфина В (DYN В), α -неоэндорфина, β -неоэндорфина, лейморфина и лейэнкефалина (Таблица 1).

Таблица 1 - Динорфины [20]

Динорфин	Аминокислотная последовательность
DYN А 1-32	Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Arg-Arg-Ile-Arg-Pro-Lys-Leu-Lys-Trp-Asp-Asn-Gln-Lys-Arg-Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Arg-Arg-Gln-Phe-Lys-Val-Val-Thr
DYN А 1-17	Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Arg-Arg-Ile-Arg-Pro-Lys-Leu-Lys-Trp-Asp-Asn-Gln
DYN А 1-13	Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Arg-Arg-Ile-Arg-Pro-Lys-Leu-Lys
Лейэнкефалин	Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu
DYN В	Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Arg-Arg-Gln-Phe-Lys-Val-Val-Thr
Лейморфин	Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Arg-Arg-Gln-Phe-Lys-Val-Val-Thr-Arg-Ser-Gln-Glu-Asp-Pro-Asn-Ala-Tyr-Tyr-Glu-Glu-Leu-Phe-Asp-Val
α -Неоэндорфин	Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Arg-Lys-Tyr-Pro-Lys
β -Неоэндорфин	Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Arg-Lys-Tyr-Pro

DYN А 1-17, первый представитель динорфинов, был выделен в 1979 году из гипофиза свиней [21, 22]. Свое название он получил от греч. δύναμις (динамис), что переводится как «сила», из-за чрезвычайно высокой биологической активности.

Динорфин высвобождается в мозге в ответ на стресс и запускает такие реакции, как анальгезия, дисфория и тревога [23]. Кроме того, он может секретироваться иммунными клетками в ответ на воспаление [24].

Пептиды семейства динорфина проявляют опиоидную активность, являясь агонистами опиоидных рецепторов μ (мю, MOR), δ (дельта, DOR) и κ (каппа, KOR), принадлежащих к семейству рецепторов, сопряженных с G-белком (G-protein coupled receptor, GPCR). За опиоидную активность пептидов отвечает общий для всех динорфинов N-концевой фрагмент Tyr-Gly-Gly-Phe, а селективность связывания с рецепторами MOR, DOR или KOR зависит от аминокислотной последовательности конкретного динорфина [25].

Эндогенные динорфины A и B подвергаются быстрому ферментативному гидролизу в биологических средах с образованием коротких фрагментов, некоторые из которых сохраняют высокую опиоидную активность при условии сохранения N-концевой последовательности Tyr-Gly-Gly-Phe, в частности DYN 1-8, DYN 1-7, DYN 1-6 и DYN 1-5. Фрагменты, сохранившие тандем Arg-Arg 6-7, в частности DYN 1-13, DYN 1-8 и DYN 1-7, обладают высокой κ -опиоидной активностью, а более короткие фрагменты DYN 1-6 и DYN 1-5 проявляют преимущественно δ -опиоидную и значительно меньшую μ -опиоидную активность. Расщепление N-концевого фрагмента Tyr-Gly-Gly-Phe под действием ряда пептидаз, таких как аминопептидаза (AP), ангиотензин конвертирующий фермент (ACE) и эндопептидаза неприлизин (NEP), приводит к инактивации опиоидной активности пептида (Рисунок 1).



Рисунок 1 – Схема метаболизма эндогенных динарфинов. AP – аминопептидаза; ACE – ангиотензин конвертирующий фермент; NEP – эндопептидаза неприлизин; THOP1 – олигопептидаза тимет

Доминирующий путь расщепления эндогенных динарфинов А и В включает высвобождение фрагмента DYN 1-5 (лейэнкефалина) под действием олигопептидазы тимет (Thimet oligopeptidase, EC 3.4.24.15; THOP1), повсеместно распространенной в тканях и внеклеточных жидкостях млекопитающих, которая переводит исходную κ-опиоидную активность динарфинов А и В преимущественно в δ-опиоидную активность высвобождаемого лейэнкефалина [26-29]. Инактивация опиоидной активности динарфинов, и лейэнкефалина в частности, также связана с расщеплением фрагмента Tyr-Gly-Gly-Phe эндопептидазой неприлизин (EC 3.4.24.11, NEP), локализованной преимущественно на мембране щеточной каймы почек и составляющей 4% от всех белков мембраны [30-32]; ангиотензин конвертирующим ферментом (EC 3.4.15.1, ACE) и аминопептидазами, которые приводят к расщеплению исходных динарфинов до пептидов, не обладающих опиоидной биологической активностью.

Эндогенные динарфины регулируют множество физиологических процессов в центральной нервной системе (ЦНС) и на периферии, включая анальгезию, двигательную активность, работу сердечно-сосудистой системы, дыхание, терморегуляцию, пищевое поведение, гормональный баланс, а также реакцию на шок, стресс и воспаление [33]. Обладая высокой биологической активностью, динарфины представляют интерес для разработки новых фармакологических средств для лечения широкого круга нозологий, включая лечение воспалительных заболеваний. Однако, основным ограничением для применения эндогенных

динорфинов в качестве фармакологических средств является их быстрое в течение нескольких минут гидролитическое расщепление и выведение из организма под действием пептидаз. Поэтому основной стратегией повышения фармакологического потенциала пептидов семейства динорфина является их модификации, направленные на повышение стабильности этих молекул в биологических средах.

1.2. Синтетические производные динорфинов

Разработка пептидных лекарственных препаратов достигла значительного прогресса за последнее десятилетие благодаря новым технологиям производства, модификации и анализа. Пептиды производятся и модифицируются как химическими, так и биологическими методами, что в сочетании с новыми стратегиями разработки и доставки позволило преодолеть присущие пептидам недостатки и обеспечить дальнейшее развитие этой области [34]. В настоящее время в международной фармацевтической индустрии зарегистрировано около 70 лекарственных препаратов на основе пептидов [35].

В начале 80-х годов двадцатого века в лаборатории синтеза пептидов Всесоюзного кардиологического научного центра АМН СССР под руководством профессора М.И. Титова был получен гексапептид Tyr-D-Ala-Gly-Phe-Leu-Arg, синтетический модифицированный аналог эндогенного DYN 1-6, – первый в мире пептидный агонист опиоидных рецепторов, вошедший в практическое здравоохранение. Благодаря замене Gly² в эндогенном пептиде на D-Ala², была существенно повышена стабильность пептида к инактивации под действием аминопептидаз. Дополнительно, эта модификация повысила аффинность модифицированного пептида к рецепторам DOR и MOR в терминах концентрации полумаксимального ингибирования (IC₅₀), показывающей сколько нужно лиганда-ингибитора для ингибирования связывания пептида с рецептором на 50%. (Таблица 2) [36, 37].

Таблица 2 - Сравнение характеристик синтетического Tyr-D-Ala-Gly-Phe-Leu-Arg [36] и эндогенного динорфина DYN 1-6 [37]

Пептид	IC ₅₀ , нМ		
	MOR	DOR	KOR
Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Arg (DYN 1-6)	17,4	4,5	226
Tyr-D-Ala-Gly-Phe-Leu-Arg	6,7	0,6	>1000

Раствор для инъекций и инфузий на основе синтетического гексапептида Tyr-D-Ala-Gly-Phe-Leu-Arg под названием «Даларгин» успешно применяется с 1987 года в СССР и России для лечения язвы желудка и двенадцатиперстной кишки [38]. За годы клинической практики было проведено множество исследований, выявивших положительные эффекты даларгина при различных патологиях, в том числе в лечении заболеваний желудочно-кишечного тракта, включая язву желудка и двенадцатиперстной кишки, различные гастропатии [39-44], панкреатит [45-48] и язвенный колит [49-54]. Было показано положительное влияние даларгина на сердечно-сосудистую систему [55-61], регенерацию повреждений, вызванных травмами и хирургическими вмешательствами [62-68]. Даларгин показал эффективность в лечении атопического дерматита [69, 70] и заболеваний легких [71-73].

В 2020-2021 гг. в ФГБУН НЦБМТ ФМБА России была разработана ингаляционная лекарственная форма гексапептида Tyr-D-Ala-Gly-Phe-Leu-Arg под названием «Лейтрагин» как лекарственное средство для лечения COVID-19.

Помимо гексапептида Tyr-D-Ala-Gly-Phe-Leu-Arg, который уже вышел в клиническую практику, ряд синтетических опиоидных пептидов активно используются в научных исследованиях как селективные агонисты опиоидных рецепторов. Гексапептид Tyr-D-Ser-Gly-Phe-Leu-Thr (DSLET) был разработан как селективный агонист δ -опиоидных рецепторов [74]. Октапептид Tyr(N-Me)-Gly-Gly-Phe-Leu-Arg-Arg(N-Me)-D-Leu был разработан как стабильный селективный агонист κ -опиоидного рецептора [75]. Пентапептид Tyr-D-Ala-Gly-Phe-D-Leu (DADLE) широко используется в научных исследованиях как селективный агонист δ -опиоидных рецепторов. Недавно, в ФГБУН НЦБМТ ФМБА России синтезирован

амид гептапептида Tyr-D-Ala-Gly-Phe-Leu-Arg-Arg-NH₂, стабилизированный аналог эндогенного DYN 1-7, селективного агониста κ-опиоидных рецепторов [76].

1.3. Динорфины и их синтетические аналоги в регуляции воспаления

Основным направлением в исследовании биологических свойств пептидов семейства динорфина традиционно является изучение регуляции боли, в том числе боли, возникающей при воспалении [24, 77-79]. Известно, что лейкоциты мигрируют в очаг воспаления и в ответ на провоспалительные стимулы, такие как липополисахарид и интерлейкин-1β (IL-1β), высвобождают DYN A 1-17 [24, 79, 80]. DYN A 1-17, подвергаясь быстрому расщеплению пептидазами в очаге воспаления, образует множество фрагментов с опиоидной активностью, которые по убыванию концентрации в очаге воспаления можно выстроить в ряд DYN 1-7 > DYN 1-6 ≈ DYN 1-9 ≈ DYN 1-10 > DYN 1-12 [10]. Основной фрагмент DYN 1-7 проявляет κ-опиоидную активность, а фрагмент DYN 1-6 имеет преимущественно δ-опиоидную активность [11]. В целом, секреция динорфина A в очаге воспаления с учетом его фрагментации обеспечивает активацию всех трех типов классических опиоидных рецепторов MOR, DOR и KOR и обеспечивает временную анальгезию в очаге воспаления [11, 12].

Помимо местного анальгетического эффекта, динорфин A и его фрагменты проявляют противовоспалительный эффект [13, 14]. DYN A 1-17 и его N-концевые фрагменты, такие как DYN 1-6, DYN 1-7, DYN 1-9, DYN 1-10 и DYN 1-11, ингибируют стимулированную липополисахаридом транслокацию ядерного фактора каппа B (NF-κB) в ядро трансформированных моноцитов человека линии THP-1 в концентрации от 10 нМ до 1 μМ, причем фрагмент DYN 1-7 проявляет наибольший эффект даже при использовании в наименьшей концентрации 10 нМ [13]. Селективный антагонист KOR ингибирует эффект DYN 1-7. В клетках THP-1, стимулированных липополисахаридом, DYN A 1-17 в концентрации от 10 пМ до 100 нМ снижал на 20% выброс IL-1β, но не влиял на выброс фактора некроза

опухоли α (TNF- α). DYN 1-6 не проявлял противовоспалительной активности, а DYN 1-7 подавлял на 30% секрецию как IL-1 β , так и TNF- α клетками THP-1 в ответ на липополисахарид в диапазоне концентраций последнего от 10 пМ до 100 нМ [13]. Таким образом, динорфин А и его фрагменты, образующиеся в очаге воспаления, проявляют умеренный противовоспалительный эффект в экспериментах *in vitro*, причем DYN 1-7 проявляет наивысшую из всех изученных фрагментов динорфина А противовоспалительную активность в диапазоне от пикомолярных до наномолярных концентраций.

Противовоспалительные свойства синтетических производных динорфина показаны в опытах *in vivo*. DADLE, стабилизированный синтетический аналог лейэнкефалина и агонист DOR, ингибирует сигнальный путь TLR4/NF- κ B, опосредуемый толл-подобным рецептором 4 (TLR4) и NF- κ B, тем самым защищая мозг крыс в условиях моделирования очаговой ишемии-реперфузии [15]. DADLE повышает выживаемость животных в крысиной модели сепсиса, вызванного перевязкой и перфорацией слепой кишки [16]. Следует отметить, что синтетические агонисты DOR не пептидной природы, напротив, могут даже усиливать воспаление, опосредуемое активацией TLR4, в зависимости от их химической структуры [81, 82].

Из синтетических производных пептидов семейства динорфина наиболее изучены противовоспалительные эффекты гексапептида Tyr-D-Ala-Gly-Phe-Leu-Arg при инъекционном и ингаляционном введениях *in vivo*. На модели острого воспалительного повреждения легких и ОРДС у мышей C57Bl/6Y было показано, что гексапептид статистически значимо повышает выживаемость животных по сравнению с контролем при комбинированном введении внутримышечно в дозе 10 мкг/кг и ингаляционно в дозе 100 мкг/кг, как в режиме профилактики, так и в режиме лечения [83]. Эффекты гексапептида на выживаемость животных в этой модели существенно усиливались при сочетанном применении с легочным сурфактантом-БЛ [84]. Tyr-D-Ala-Gly-Phe-Leu-Arg статистически значимо снижал в легких транскрипцию генов провоспалительных цитокинов, таких как IL-1 β и IL-6, а также интерферонов α (IFN- α) и β (IFN- β), при вышеуказанном

комбинированном внутримышечном и внутрилегочном введении [18]. Инъекционное внутримышечное введение Tyr-D-Ala-Gly-Phe-Leu-Arg было менее эффективно, чем комбинированное в сочетании с ингаляционным, и статистически значимо снижало только уровни мРНК IFN- α в легких. Было показано, что ингаляционное введение Tyr-D-Ala-Gly-Phe-Leu-Arg значительно ингибирует секрецию HMGB1 в легких мышей с острым повреждением легких, вызванным липополисахаридом [17]. Выявленный в ФГБУН НЦБМТ ФМБА России механизм действия Tyr-D-Ala-Gly-Phe-Leu-Arg включает снижение ацетилирования остатков лизина в сайтах ядерной локализации HMGB1, что препятствует секреции HMGB1 из ядра в цитоплазму и далее во внеклеточное пространство. Известно, что ацетилирование HMGB1 является необходимым условием для его транслокации во внеклеточную среду, где HMGB1 действует как провоспалительный цитокин, который связывается преимущественно с TLR4 рецептором, тем самым стимулируя иммунные клетки, эндотелиальные клетки и клетки эпителия дыхательных путей к выработке цитокинов, хемокинов и других воспалительных медиаторов [85]. Авторы связали обнаруженный эффект Tyr-D-Ala-Gly-Phe-Leu-Arg на ацетилирование HMGB1 с повышением транскрипции гена ядерной деацетилазы SIRT1, для которой HMGB1 является субстратом [86]. Налоксон, неспецифичный ингибитор DOR и MOR, подавлял эффект гексапептида [20]. В целом, это открытие связывает противовоспалительное действие Tyr-D-Ala-Gly-Phe-Leu-Arg с его воздействием на экспрессию SIRT1.

В клинических исследованиях было показано, что эндоназальное введение Tyr-D-Ala-Gly-Phe-Leu-Arg по 2 мг в сутки в течение 10 дней (всего 3 курса за 3 мес) статистически значимо снижает уровни TNF- α на 9,4%, а уровни IL-6 на 6,1% в крови больных ишемической болезнью сердца с метаболическим синдромом, находящихся на стандартной терапии [87].

В целом, результаты опубликованных научных исследований свидетельствуют о наличии противовоспалительной активности у эндогенных динорфинов и их синтетических аналогов, причем в качестве механизмов противовоспалительного действия динорфинов в литературе указывается их

влияние на канонический путь активации транскрипционного фактора NF-κB, ответственного за транскрипцию провоспалительных цитокинов и хемокинов, а также их воздействие на экспрессию SIRT1. С учетом того, что NF-κB является субстратом SIRT1, а деацетилирование субъединицы p65 в составе димера NF-κB подавляет транскрипционную активность последнего [88], противовоспалительные эффекты динорфинов могут быть обусловлены их влиянием на сигнальные пути, где в условиях воспаления происходит взаимодействие NF-κB и SIRT1.

1.4. Роль сиртуинов в регуляции воспаления

Обратимое *in vivo* ацетилирование-деацетилирование остатков лизина относится к наиболее важным посттрансляционным модификациям, изменяющим функциональные свойства белков. Процесс ацетилирования опосредуется гистоновыми ацетилтрансферазами (histone acetyltransferase, HAT), а процесс деацетилирования – гистоновыми деацетилазами (histone deacetylase, HDAC). Из-за обратимости реакций ацетилирования-деацетилирования уровень ацетилирования белков определяется текущим балансом активностей HAT и HDAC. С учетом того, что остаток лизина положительно заряжен при физиологическом pH 7,4 вследствие протонирования ε-аминогруппы лизина, а остаток ацетилированного лизина является электронейтральным, реакции ацетилирования-деацетилирования существенно меняют заряд, конформацию и, соответственно, биологические свойства белков.

Сиртуины относятся к гистоновым деацетилазам III класса, активность которых зависит от наличия никотин-аденин-динуклеотида (NAD⁺) в качестве кофактора [89]. Остальные три класса гистоновых деацетилаз I, II, IV относятся к классическим Zn⁺-зависимым HDAC. Сиртуины участвуют в многочисленных биологических процессах и регулируют критически важные сигнальные пути в организмах прокариот и эукариот. Семь известных сиртуинов млекопитающих, обозначаемых здесь как SIRT1–SIRT7, отличаются структурой и субклеточной

локализацией. Сиртуины SIRT1 и SIRT6 локализованы в ядре клетки, SIRT7 – в ядрышке, SIRT2 – преимущественно в цитоплазме клетки, а SIRT3, SIRT4 и SIRT5 – в митохондриях [90]. Сиртуины катализируют реакцию деацетилирования остатков ацетил-лизина в составе белковых молекул (Рисунок 2).

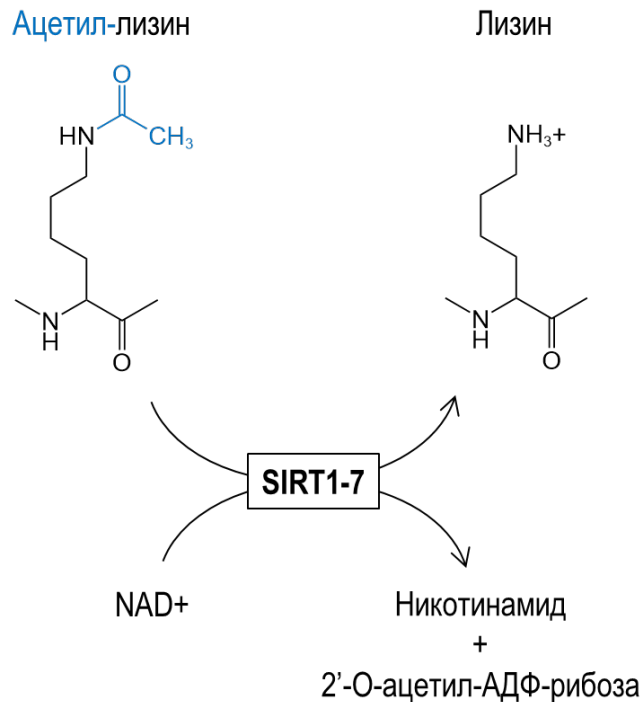


Рисунок 2 - NAD⁺-зависимая реакция деацетилирования остатков ацетил-лизина в составе белков-субстратов сиртуинами 1-7

Ядерный SIRT1 – наиболее изученный сиртуин млекопитающих. Согласно недавнему анализу [91], субстраты SIRT1 не имеют какой-либо специфичной аминокислотной последовательности, поэтому SIRT1 деацетилюет широкий ряд субстратов, в число которых входят гистоны, транскрипционные факторы, ко-активаторы, ферменты и другие негистоновые белки. С учетом разнообразия функций субстратов SIRT1, этот фермент может влиять на разнообразные биологические процессы, такие как рост, пролиферация, апоптоз и выживаемость клеток, репарацию ДНК, активность транскрипционных факторов, участвующих в регуляции метаболизма, антиоксидантной активности и биогенеза митохондрий (Таблица 3).

Таблица 3 - Субстраты SIRT1

Субстрат	Функция SIRT1	Ссылки
Гистоны		
H1 (K ²⁶)	Образование факультативного гетерохроматина	92
H3 (K ⁹)	Подавление транскрипции, образование гетерохроматина	92
H4 (K ¹⁶)	Подавление транскрипции, образование гетерохроматина	92-94
Транскрипционные факторы / ко-активаторы		
p65 (K ³¹⁰)	Инактивация NF-κB, подавление воспаления	88
HIF-1α	Инактивация HIF-1α, подавление ответа на гипоксию	95
c-Мус	Активация c-Мус, пролиферация и рост клеток	96, 97
E2F1	Инактивация E2F1, подавление апоптоза	98
FOXO1	Инактивация FOXO1, подавление глюконеогенеза	99
p53	Инактивация p53, повышение выживаемости при стрессе	100
FOXO3a	Активация FOXO3a, экспрессия генов антиоксидантов	101, 102
FOXO4	Активация FOXO4, повышение выживаемости клеток	103
PGC-1α	Активация PGC-1α, биогенез митохондрий	104
SREBP-1c	Инактивация SREBP-1c, ингибирование липогенеза	105
PPARγ	Инактивация PPARγ, ингибирование адипогенеза	106
Ферменты и другие белки		
Ku70	Активация Ku70, репарация ДНК	107
eNOS	Активация eNOS, увеличение продукции оксида азота	108
HMGB1	Снижение внеклеточного HMGB1, снижение воспаления	109
Примечание: H1, H3, H4 – гистоны 1, 3 и 4; p65 – субъединица фактора NF-κB; HIF-1α – гипоксией индуцируемый фактор 1α; c-Мус – фактор транскрипции c-Мус; E2F1 – фактор транскрипции E2F1; FOXO1, 3a и 4 – forkhead box белок O1, O3a и O4; p53 – фактор транскрипции p53; PGC-1α – коактиватор 1α активируемого пролифераторами пероксисом рецептора гамма; SREBP-1c – белок 1c; PPARγ – активируемый пролифераторами пероксисом рецептор гамма; Ku70 – белок Ku70; eNOS - эндотелиальная синтаза оксида азота.		

Одной из важнейших функций SIRT1 является его способность снижать воспалительный ответ и способствовать разрешению воспаления через деацетилирование и инактивацию транскрипционного фактора NF-κB, а также деацетилирование белка HMGB1, известного медиатора летальности при сепсисе [85] и COVID-19 [110].

Предполагается, что общее число субстратов SIRT1 может быть намного выше указанного в Таблице 3. Сравнительное исследование ацетилома у мышей дикого типа и мышей нокаутных по гену SIRT1 выявило 270 потенциальных белков-субстратов SIRT1, из которых 226 белков обнаруживаются у человека [111]. Еще в одном исследовании, использовавшем вычислительный метод отбора

потенциальных субстратов SIRT1 с учетом анализа аминокислотных последовательностей и их функциональных особенностей, общее возможное число кандидатов-субстратов SIRT1 было оценено в 1590 белков [112]. В целом, эти исследования указывают на разнообразие ролей SIRT1 в биологических процессах и необходимость дальнейших исследований в этой области для расширения представлений о функциональной значимости SIRT1.

Цитоплазматический SIRT2 деацетилюет преимущественно цитоплазматические белки-субстраты. Количественный протеомный анализ ацетилома лизина выявил 56 экспериментально валидированных субстратов SIRT2 [50], включая белок цитоскелета α -тубулин [113] и транскрипционный фактор парный бокс 7 (PAX7), отвечающий за развитие скелетной мускулатуры и поддержание пула сателлитных клеток [114]. Наряду с SIRT1, SIRT2 участвует в регуляции воспалительного ответа, деацетилюя в цитоплазме субъединицу p65 транскрипционного фактора NF- κ B [115], а также деацетилюя лизины в составе сайтов ядерной локализации белка HMGB1 [116].

Митохондриальный SIRT3 может напрямую деацетилировать не менее 84 митохондриальных белков, участвующих в функционировании митохондрий, включая такие аспекты как митохондриальный митоз, транскрипцию, трансляцию, процессинг ДНК и РНК, метаболизм аминокислот и липидов, окислительное фосфорилирование и цикл трикарбоновых кислот [117].

Митохондриальный SIRT4 функционирует преимущественно как АДФ-рибозилтрансфераза и деацилаза (липоамидаза, деглутарилаза и деметилглутарилаза), регулируя ферменты, участвующие в катаболизме аминокислот, окислении жирных кислот и производстве аденозинтрифосфата (АТФ) [118].

Митохондриальный SIRT5 имеет уникальную биологическую структуру, позволяющую деацилировать лизины, модифицированные двухосновными карбоновыми кислотами, субстратами цикла трикарбоновых кислот [119].

Ядерный SIRT6 помимо деацетилазной активности, имеет способность удалять остатки более длинных жирных кислот, а также проявляет АДФ-

рибозилтрансферазную активность [120]. SIRT6 участвует в процессах восстановления ДНК и хроматина, а также в регуляции метаболизма. Противовоспалительный эффект SIRT6 связан с его способностью деацетилировать гистон H3 (K⁹), что препятствует связыванию субъединицы p65 фактора NF-κB с промотором целевого гена и тем самым уменьшает воспалительный ответ [121].

Ядерный SIRT7 присутствует как в просвете ядра, так и в ядрышке, где контролирует транскрипцию рибосомной ДНК и поддерживает упаковку хроматина в качестве защиты от гомологичной рекомбинации и повреждений [122].

В целом, из семи известных сиртуинов млекопитающих три, а именно SIRT1, SIRT2 и SIRT6, могут прямо участвовать в разрешении воспаления через деацетилирование субъединицы p65 (K³¹⁰) транскрипционного фактора NF-κB сиртуинами SIRT1 и SIRT2, деацетилирование ряда лизинов в сайте ядерной локализации белка HMGB1 сиртуинами SIRT1 и SIRT2, а также через деацетилирование гистона H3 (K⁹) сиртуинами SIRT1 и SIRT6. С учетом этого, SIRT1, SIRT2 и SIRT6 представляют собой потенциальные биологические мишени для разработки средств, направленных на снижение и разрешение воспаления.

1.5. Ядерный фактор NF-κB в регуляции воспаления в легких

Ядерный фактор NF-κB представляет собой семейство транскрипционных факторов, играющих центральную роль в координации воспалительных реакций, врожденного и адаптивного иммунитета [123]. Семейство включает пять структурно связанных членов, а именно NF-κB1 (p50), NF-κB2 (p52), RelA (p65), RelB и c-Rel, которые, образуя гомо- и гетеродимеры, связываются со специфическим элементом ДНК энхансером κB и запускают транскрипцию целевых генов. Из всех возможных вариантов сочетаний гетеродимер p50/p65, также известный как p50/RelA, является наиболее распространенной

димеризованной формой NF-κB, обнаруживаемой практически во всех типах клеток. В нестимулированных клетках димер p50/p65 находится преимущественно в неактивной форме за счет образования комплекса с ингибитором κB (IκB), который поддерживает гомеостатическую локализацию димеров NF-κB в цитоплазме и ингибирует их ДНК-связывающую активность.

Активация NF-κB может идти двумя путями – каноническим и неканоническим.

Канонический путь активации NF-κB представляет собой быстрый механизм ответа на воспалительные стимулы. Такими стимулами могут служить молекулярные паттерны, ассоциированные с патогеном (pathogen-associated molecular pattern, PAMP), и молекулярные паттерны, ассоциированные с повреждением (damage-associated molecular pattern, DAMP), которые распознаются рецепторами распознавания паттернов (pattern recognition receptor, PRR). PAMP представляют собой уникальные, консервативные молекулярные структуры, присутствующие у микроорганизмов (бактерий, вирусов, грибов), но отсутствующие у хозяина, тогда как DAMP – это эндогенные молекулы хозяина, выделяемые поврежденными тканями и запускающие неинфекционный воспалительный ответ. Клетки млекопитающих экспрессируют пять семейств PRR, в том числе семейство толл-подобных рецепторов (TLR), RIG-I-подобных рецепторов (RLR), NOD-подобных рецепторов (NLR), лектиноподобных рецепторов типа C (CTLLR) и семейство цитозольных ДНК-сенсоров (DNAS). Хотя различные семейства PRR имеют различные структурные свойства, субклеточную локализацию и отвечают на разные PAMP/DAMP, они имеют сходство в сигнальных путях, причем активация канонического пути NF-κB является общим сигнальным событием для всех вышеуказанных PRR [124].

Активация NF-κB начинается с фосфорилирования IκB по двум остаткам серина на N-конце под действием IκB киназы (IKK), что ведет к убиквитинированию IκB по остатку K⁴⁸ и его деградации протеосомным комплексом S26 с последующим высвобождением димера NF-κB, преимущественно p50/p65, его транслокацией в ядро и началу транскрипции

целевых генов. ИКК состоит из двух каталитических субъединиц ИКК α и ИКК β , а также регуляторной субъединицы ИКК γ , известной также как необходимый модулятор NF- κ B (NF- κ B essential modulator, NEMO). ИКК активируется фосфорилированием под действием киназы TAK1 (трансформирующим фактором роста β активируемая киназа 1), которая является точкой конвергенции сигнальных путей для всех PRR. Такая же схема активации канонического пути NF- κ B с участием TAK1 и комплекса ИКК α /ИКК β /NEMO реализуется при активации антигенами рецептора В-клеток (BCR) [125], рецептора Т-клеток (TCR) [126], а также при активации рецепторов провоспалительных цитокинов, таких как рецептор фактора некроза опухоли TNFR1 [127] и рецептора интерлейкина-1 типа 1 (IL-R1) [128]. Транслокация свободного димера NF- κ B в ядро ведет к началу транскрипции целевых генов. Последние по их функциям могут быть отнесены в несколько категорий.

За воспалительный ответ отвечают гены цитокинов, таких как IL-1 β , IL-6 и TNF- α , гены хемокинов, таких как интерлейкин 8 (IL-8) и моноцитарный хемотаксический протеин-1 (MCP-1), привлекающий моноциты, Т-клетки и дендритные клетки к местам воспаления, повреждения тканей или инфекции, а также гены молекул адгезии, таких как молекула межклеточной адгезии 1 (ICAM-1), молекула адгезии сосудистых клеток 1 (VCAM-1) и Е-селектин. За ингибирование апоптоза и выживание клеток отвечают гены, такие как ген регулятора апоптоза Bcl-2 и антиапоптотические белки XIAP, IAP1, IAP2 и FLIP. За регуляцию клеточного цикла и пролиферацию отвечают гены циклина D1 и c-Myc. Кроме того, активация NF- κ B запускает транскрипцию опиоидных рецепторов MOR [129] и DOR [130], а также транскрипцию KOR, но не прямо, а опосредованно через c-Myc [131]. Ген продинорфина содержит несколько мотивов κ B, поэтому NF- κ B предположительно также участвует в экспрессии продинорфина в условиях воспаления [132]. Схема канонического пути активации NF- κ B представлена на Рисунке 3.

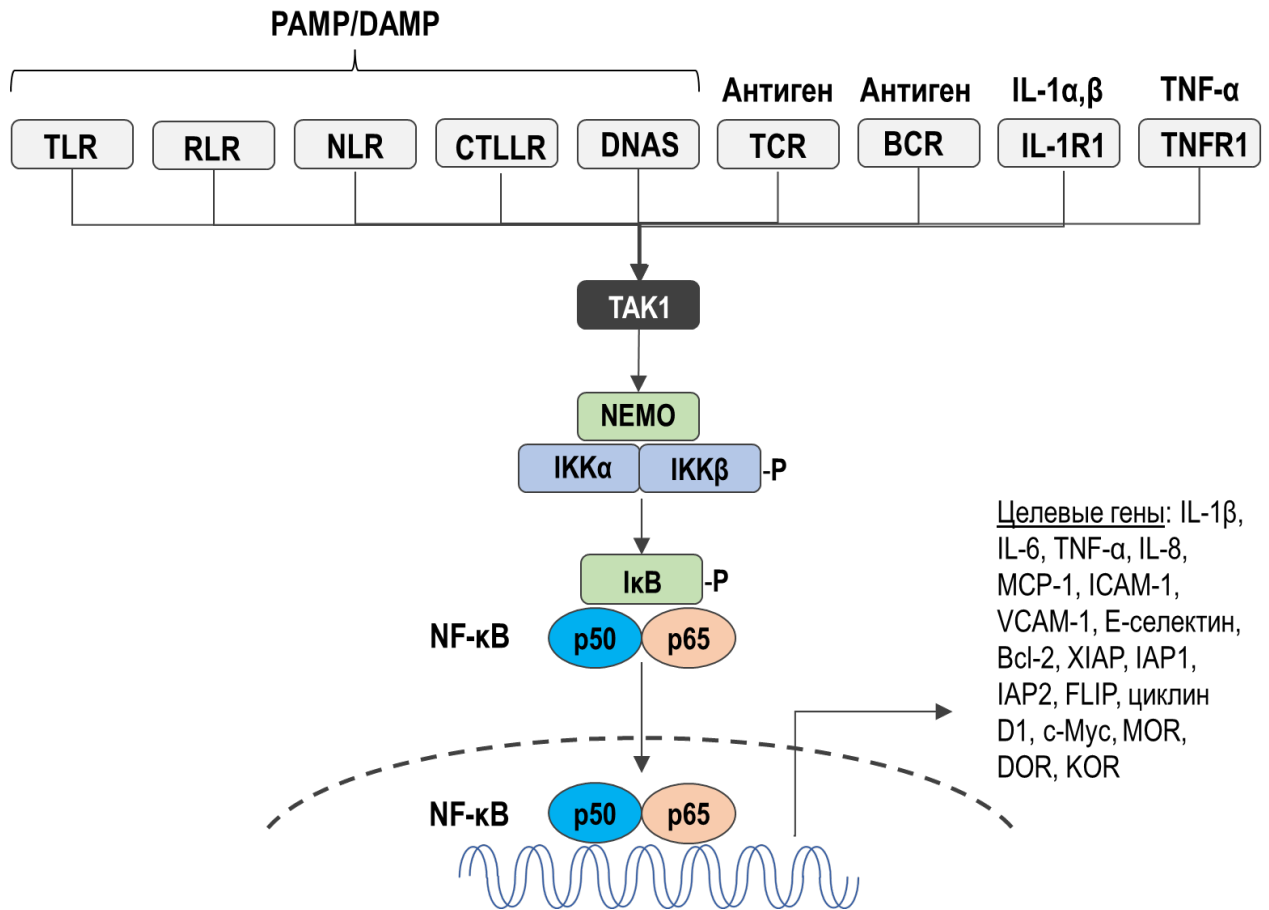


Рисунок 3 – Схема активации NF- κ B лигандами рецепторов PRR, TCR, BCR, IL-1R1 и TNFR1

TLR – рецепторы важнейшего семейства трансмембранных PRR врожденной иммунной системы, которые экспрессируются в альвеолярных макрофагах, дендритных клетках и эпителиальных клетках легкого и играют критическую роль в нормальном развитии легких, защите организма от легочных инфекций и регенерации легких после повреждения [133]. Все десять членов семейства TLR обнаруживаются в эпителиальных клетках бронхов [134]. Альвеолярные макрофаги экспрессируют преимущественно рецепторы TLR1, TLR2, TLR4, TLR7 и TLR8, и в меньшей степени TLR3, TLR5 и TLR9 [135]. Эндотелиальные клетки легких экспрессируют TLR4, критически важный рецептор для привлечения нейтрофилов в очаг воспаления, вызванного LPS [136]. Роль TLR в распознавании PAMP и инициации врожденного иммунного ответа, направленного на удаление специфических патогенов при острых (пневмония, острый респираторный

дистресс-синдром) и хронических заболеваниях легких (хроническая обструктивная болезнь легких, фиброз, астма), широко обсуждается в научной литературе [133, 137]. Рецепторы TLR, расположенные на поверхности клеточной мембраны, распознают, в частности, такие консервативные PAMP/DAMP как триациллипептиды (TLR1/2), диациллипептиды, липотейхоевую кислоту, дрожжевой зимозан (TLR2/6), пептидогликан грамм-положительных бактерий, липоарабиноманнан микобактерий, гилауронан (TLR2), липополисахарид грамм-отрицательных бактерий, HMGB1 (TLR4), белок флагеллин (TLR5). Внутриклеточные TLR распознают двухцепочечную ДНК вирусов (TLR3), одноцепочечную РНК вирусов (TLR7 и TLR8), а также GpC-динуклеотиды в составе ДНК (TLR9).

Пневмония – ведущее заболевание легких, характеризующееся воспалением и нарушением регуляции иммунного ответа, центральное место в патогенезе которого играет сигнальный путь TLR4/NF-κB [138]. Этот путь необходим для распознавания и элиминации патогенов, таких как *Streptococcus pneumoniae* [139], *Staphylococcus aureus* [140] и SARS-CoV-2 [141], однако его чрезмерная активация может привести к тяжелому воспалению, повреждению тканей и серьезным осложнениям, включая ОРДС и сепсис. Помимо вышеуказанных патогенов, TLR4 распознает широкий спектр PAMP/DAMP, включая липополисахарид грамотрицательных бактерий через адаптерный белок фактор дифференцировки миелоидных клеток-2 (MD-2) [142-144], различные PAMP бактерий, вирусов и грибов, а также DAMP, такие как HMGB1, белки теплового шока и компоненты внеклеточного матрикса [145]. В условиях острых легочных инфекций в организации иммунного ответа TLR тесно взаимодействуют с рецепторами других семейств PRR, такими как рецепторы семейства NOD-подобных рецепторов [146] и RIG-I-подобных рецепторов [147].

Неканонический путь активации NF-κB селективно отвечает на специфическую группу стимулов, которые активируют рецепторы CD40, RANK, LT-βR и BAFF-R, и функционально является дополнительным путем, который взаимодействует с каноническим путем NF-κB в регуляции специфических

функций адаптивной иммунной системы, в частности созревания, выживания и адгезии В-лимфоцитов и лимфопоэза [148].

1.6. Взаимодействие NF-κB и сиртуинов в разрешении воспаления

Сила и продолжительность действия NF-κB существенно регулируется посттрансляционным ацетилированием остатков лизина [149]. Белок p65 – наиболее распространенный член семейства NF-κB, имеет семь сайтов ацетилирования: K¹²², K¹²³, K²¹⁸, K²²¹, K³¹⁰, K³¹⁴ и K³¹⁵, а его белок-партнер p50 в составе димера – по меньшей мере три сайта K⁴³¹, K⁴⁴⁰ и K⁴⁴¹, вовлеченных в регуляцию активности NF-κB [149-151] (Рисунок 4).

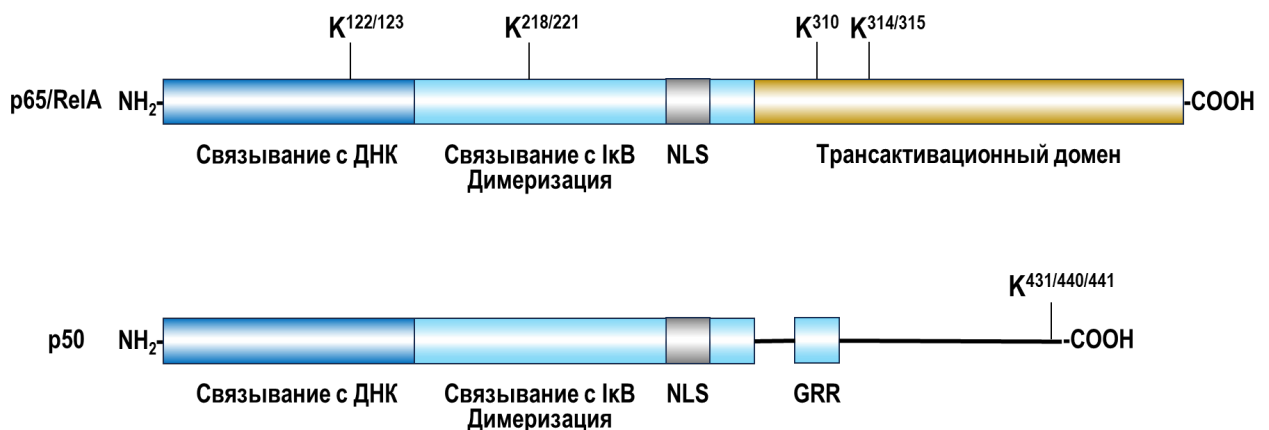


Рисунок 4 – Сайты ацетилирования p65 и p50. NLS – сайт ядерной локализации; GRR – регион, обогащенный глицином

После высвобождения из комплекса с ингибитором IκB и транслокации в ядро, NF-κB вступает в физическое взаимодействие с гистоновыми ацетилтрансферазами p300 и CBP [152-154], которые способны ацетилировать p65 по пяти сайтам ацетилирования K¹²², K¹²³, K²¹⁸, K²²¹ и K³¹⁰ [149-153]. Гистоновая ацетилтрансфераза PCAF ацетилирует p65 по лизину K¹²² [149]. Ацетилирование отдельных сайтов p65 регулирует различные ядерные функции NF-κB и влияет на его связывание с κB энхансером в составе ДНК и цитоплазматическим κB

ингибитором, а также на транскрипционную активность NF-κB. Ацетилирование K²²¹ усиливает связывание NF-κB с ДНК, существенно снижая при этом способность NF-κB связываться с ингибитором IκB [149, 150]. Ацетилирование K²¹⁸ снижает способность NF-κB связываться с κB ингибитором [149]. Ацетилирование K³¹⁰ не влияет на связывание NF-κB с κB энхансером и κB ингибитором, но является необходимой посттрансляционной модификацией для достижения полной транскрипционной активности NF-κB [149, 150]. Ацетилирование K^{122/123} снижает как связывание NF-κB с κB энхансером, так и транскрипционную активность NF-κB [149, 151]. Еще два сайта ацетилирования K^{314/315} расположены в трансактивационном домене p65, ацетилирование которых, как полагают, состоит в предотвращении репрессии генов, связанной с метилированием p65, и повышении селективности к промоторам [155]. Белок p50 также имеет сайты ацетилирования K⁴³¹, K⁴⁴⁰ и K⁴⁴¹, ацетилирование которых способствует связыванию с ДНК и повышению транскрипционной активности гетеродимера p50/p65 [149, 156-158]. Роль ацетилирования в регуляции транскрипции остальных членов семейства NF-κB изучена недостаточно [149].

Ацетилирование субъединиц NF-κB относится к регулируемым процессам и инициируется действием провоспалительных стимулов, в частности TNF-α [152] и липополисахаридом [159].

Ацетилирование NF-κB обратимо *in vivo* [149, 160]. Ряд гистоновых деацетилаз деацетилирует ацетилированный белок p65. С учетом того, что ацетилирование K¹²² и K¹²³ отрицательно регулирует активность NF-κB, а ацетилирование K²¹⁸, K²²¹ и K³¹⁰, напротив, усиливают транскрипционную активность NF-κB, нетто эффект индивидуальных гистоновых деацетилаз на активность NF-κB зависит от их селективности к указанным сайтам ацетилирования NF-κB. В частности, ядерная гистоновая деацетилаза I класса HDAC3 в ранних работах рассматривалась как основной фермент, деацетилирующий и репрессирующий транскрипционную активность димера p50/p65 в ответ на действие TNF-α [151, 152]. Однако, в противоположность этому, позднее было показано, что HDAC3 необходим для экспрессии генов в ответ на

стимуляцию IL-1, а также было показано, что HDAC3 вовлечен в удаление ингибиторного ацетилирования p65 по остаткам ацетил-лизина K¹²² и K¹²³ [161] и усиливает экспрессию TNF- α в кардиомиоцитах, стимулированных липополисахаридом [162]. Таким образом, в настоящее время HDAC3 рассматривается скорее как фактор, способствующий развитию воспаления [163]. HDAC1 взаимодействует физически с p65 и подавляет транскрипционную активность NF- κ B в ответ на TNF- α [164]. HDAC2 не взаимодействует с p65 прямо, но отрицательно влияет на активность NF- κ B через взаимодействие с HDAC1 [164]. HDAC5 взаимодействует с p65 и снижает ацетилирование остатка лизина K³¹⁰ в составе p65, который отвечает за транскрипционную активность NF- κ B [165]. В целом, влияние гистоновых деацетилаз классов I, II и IV на активность NF- κ B является сложным, и может как повышать активность NF- κ B (HDAC1, HDAC2, HDAC3, HDAC5), так и снижать активность NF- κ B (HDAC3), в зависимости от селективности к отдельным сайтам ацетилирования в составе димера NF- κ B.

Согласно многочисленным исследованиям, основную роль в снижении активности NF- κ B и разрешении воспаления играет гистоновая деацетилаза III класса SIRT1. Ядерный SIRT1 физически взаимодействует с белком p65 и деацетилирует остаток ацетил-лизина K³¹⁰, тем самым снижая транскрипционную димера NF- κ B [88]. Вспомогательную роль в подавлении транскрипционной активности NF- κ B играет цитозольный SIRT2, который также деацетилирует остаток ацетил-лизина K³¹⁰ в составе p65 [166]. Согласно этим данным сиртуин 1 рассматривается как фармакологическая мишень, связанная с разрешением воспаления при лечении таких заболеваний, как воспалительные заболевания легких, а также сепсис, стеатоз и фиброз печени [167].

Особенностью SIRT1 является то, что он может выполнять функцию обратной отрицательной связи к действию ряда транскрипционных факторов, в частности E2F1 [168], c-MYC [169] и HIF-1 α [170, 171]. Наряду с транскрипцией целевых генов, эти факторы инициируют транскрипцию гена SIRT1, который после превращения в белок SIRT1, в свою очередь, деацетилирует остатки лизинов в составе этих же факторов, ингибируя тем самым их транскрипционную активность.

Ряд исследований указывает на то, что экспрессия SIRT1 может также выполнять роль отрицательной обратной связи в процессах воспаления, регулируемых транскрипционной активностью NF-κB [88, 150, 151, 172-176]. Консервативный мотив связывания NF-κB обнаруживается трижды в пределах последовательности промотора гена SIRT1 человека [175], причем все мотивы связывания NF-κB функциональны, и субъединицы p65 и p50 гетеродимера NF-κB, связываясь с промотором, многократно повышают уровни мРНК SIRT1 [172]. Отсроченная повышенная экспрессия мРНК SIRT1 в условиях активации NF-κB была подтверждена в экспериментах *in vitro* при стимуляции клеток TNF-α и липополисахаридом [174, 176], причем было обнаружено, что в этом процессе ключевую роль играет p65 [176]. В свою очередь, SIRT1 снижает транскрипционную активность NF-κB, деацетилируя остаток лизина K³¹⁰ в составе p65, тем самым ограничивая воспаление [88, 150, 151]. Опираясь на эти факты, Каурпинен и др. [173] выдвинули гипотезу, что экспрессия SIRT1 при воспалении играет роль отрицательной обратной связи, ограничивающей воспаление, где NF-κB действует как положительный регулятор транскрипции гена SIRT1, а экспрессируемый SIRT1 выполняет роль отрицательного регулятора активности NF-κB (Рисунок 5).

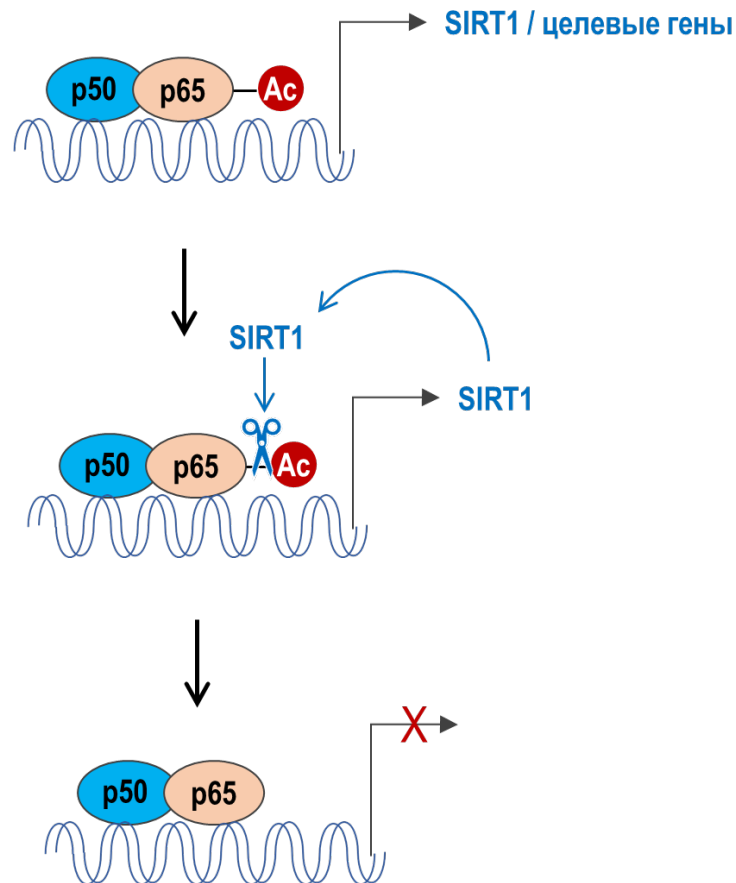


Рисунок 5 – Взаимодействие NF-κB и SIRT1 в условиях воспаления. Транслокация активного ацетилированного димера p50/p65 запускает экспрессию SIRT1, вновь образованный SIRT1 деацетилюет p65 (K³¹⁰), тем самым инактивируя транскрипционную активность NF-κB, и подавляя транскрипцию провоспалительных целевых генов, что ведет к разрешению воспаления

Однако, эта гипотеза все еще нуждается в экспериментальном подтверждении, тем более что имеются противоречащие этой гипотезе данные о подавлении экспрессию SIRT1 в печени и лейкоцитах мышей на уровне мРНК и белка в первые часы после введения липополисахарида, известного активатора NF-κB [177].

В целом, тот факт, что SIRT1 регулирует активность NF-κB и играет ключевую роль в разрешении воспаления, в том числе при заболеваниях дыхательных путей [167, 178], делает актуальным создание лекарственных препаратов, направленных на повышение активности SIRT1, для лечения воспалительных заболеваний, включая воспалительные заболевания легких.

1.7. Фармакологические активаторы сиртуинов

Основным фармакологическим подходом к созданию активаторов сиртуинов является разработка аллостерических модуляторов активности этих ферментов. Исторически, ряд полифенолов и алкалоидов из растений проявляет подобную активность в отношении SIRT1, в том числе полифенол ресвератрол, содержащийся в красном винограде и ягодах, а также его метаболит пицеатаннол, изохинолиновый алкалоид берберин и полифенол куркумин [179, 180]. Кроме того, модулирующую активность в отношении SIRT6 проявляют такие природные соединения, как цианидин, обнаруживаемый в винограде и красном луке, флавоноид кверцетин, содержащийся в луке, чае и яблоках, флавонол физетин, содержащийся в клубнике и яблоках, лютеолин, содержащийся в сельдерее, тимьяне и зеленом перце, а также олеиновая и линолевая кислоты [181]. Однако, природные стимуляторы сиртуинов имеют ряд общих недостатков, а именно достаточно низкую активность и как правило низкую биодоступность при пероральном введении. Поэтому ведется активная разработка малых синтетических активаторов сиртуинов с упором на повышенную активность и биодоступность молекул [182-184].

Активация транскрипции гена SIRT1 представляет собой новый альтернативный подход к лечению воспалительных заболеваний, который был реализован клинически пока только в единственном случае гексапептида Tug-D-Ala-Gly-Phe-Leu-Arg. Успешные результаты клинических испытаний лекарственного препарата, содержащего это синтетическое производное динорфина в качестве действующего вещества, в лечении COVID-19 указывают на перспективность этого подхода повышения транскрипции SIRT1 к лечению воспалительных заболеваний легких, и определяют актуальность исследований в области разработки и применения синтетических производных динорфина как потенциально нового класса противовоспалительных средств для лечения заболеваний легких.

1.8. Моделирование острого воспаления легких

Согласно литературным данным, острое воспаление легких у грызунов может быть вызвано гипероксией, геморрагическим шоком, инфекционными агентами, а также патоген-ассоциированными молекулярными структурами [185]. Релевантное моделирование острого воспаления легких построено на прямом инфицировании мышей линий C57Bl/6J или BALB/c бактериями *Streptococcus pneumoniae* (инфекционная модель воспаления) или на интратрахеальном введении липополисахарида *E. coli* O55:B5 («стерильная» модель воспаления) [185]. Каждая из моделей имеет свои недостатки. Недостатком инфекционной модели воспаления легких является наличие специальных требований к проведению исследований в специализированных лабораторных помещениях, допускающих работу с инфекциями. Недостатком «стерильной» модели воспаления легких являются трудности с моделированием тяжелого и фатального воспаления легких. Поэтому модель воспаления с использованием липополисахарида была модифицирована, для чего мышам вначале вводили интратрахеально α -галактозилцерамид, агонист инвариантных натуральных Т киллеров, чтобы сенсibilизировать животных к последующему введению индуктора воспаления липополисахарида *E. coli* 0111:B4 и обеспечить тяжелый фатальный характер воспаления [186]. К недостаткам этого способа следует отнести необходимость проведения двух последовательных, с разрывом 12 – 24 часа, интратрахеальных введений мышам под наркозом, что делает модель сложной в исполнении и влияет на течение воспалительного процесса. С учетом этого, модель с двумя последовательными введениями α -галактозилцерамида и липополисахарида была модифицирована в ФГБУН НЦБМТ ФМБА России [187]. Интратрахеальное введение α -галактозилцерамида было заменено ингаляционным введением, что упростило модель. Кроме того, в состав индуктора воспаления помимо липополисахарида *E. coli* O55:B5, агониста TLR4, были включены мурамилпептид и адьювант Фрейнда, обеспечивающие индукцию воспалительного ответа через активацию NOD-подобных рецепторов, что обеспечило признаки тяжелого и фатального воспаления легких и ОРДС у мышей

линии С57В1/6У, которая разводится в питомниках России. Эта модифицированная модель характеризуется тяжелым течением воспаления легких, признаками пневмонии и ОРДС и может быть использована для изучения механизмов действия противовоспалительных препаратов в условиях, релевантных пневмонии и ОРДС у человека.

1.9. Выводы по главе 1

1. Динорфины – семейство эндогенных пептидов с высокой биологической активностью.

2. Динорфин А (1-17) секретируется иммунными клетками в очаге воспаления и подвергается быстрому расщеплению пептидазами с образованием короткоживущих фрагментов, среди которых наиболее представлены гексапептид динорфин (1-6) и гептапептид динорфин (1-7), проявляющие умеренную противовоспалительную активность в опытах *in vitro*, в интервале от наномолярных до низких микромолярных концентраций.

3. Модификация эндогенных динорфинов с целью повышения их устойчивости к пептидазам в биологических средах – основное направление в разработке синтетических терапевтических пептидов на основе динорфинов.

4. Гексапептид Tyr-D-Ala-Gly-Phe-Leu-Arg, синтетическое производное эндогенного динорфина (1-6), вышел в клиническую практику с широким спектром показаний к применению от лечения язвы желудка и панкреатита до лечения COVID-19.

5. Выявленный механизм противовоспалительного действия гексапептида Tyr-D-Ala-Gly-Phe-Leu-Arg включает повышение транскрипции гистоновой деацетилазы сиртуина 1, известного противовоспалительного фактора, модулирующего активность канонического пути активации NF-κB, однако, неизвестно, насколько общим является этот выявленный механизм для других пептидов семейства динорфина; неизвестно, влияет ли гексапептид Tyr-D-Ala-Gly-

Phe-Leu-Arg и другие производные динорфина на транскрипцию других шести членов семейства сиртуинов; а также неизвестно, как гексапептид Tyr-D-Ala-Gly-Phe-Leu-Arg влияет на динамику воспалительного процесса с участием провоспалительных цитокинов.

6. Согласно литературным данным, эндогенный фрагмент динорфина (1-7) обладает наивысшей противовоспалительной активностью *in vitro* среди остальных динорфинов, однако, противовоспалительная активность синтетических производных динорфина (1-7) не изучена.

7. Моделирование острого воспаления легких на мышах C57Bl/6Y путем последовательного ингаляционного введения α -галактозилцерамида и интратрахеального введения липополисахарида *E. coli* 055:B5 совместно с мурамилпептидом и адьювантом Фрейнда обеспечивает воспалительный процесс в легких, релевантный воспалительному процессу, наблюдаемому у человека при пневмониях и ОРДС.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Материалы

α -Галактозилцерамид (α -GalCer) и липополисахарид *E. coli* 055:B5 были приобретены в “Sigma-Aldrich” (“Merck”, США). Набор РНК-экстран для извлечения РНК был приобретен в ООО «Синтол» (Россия). Набор РЕВЕРТА-L для синтеза кДНК был получен от ООО «АмплиСенс» (Россия). Золетил 100, медитамидин и антиседан были получены от “Virbac” (Франция), «Ари-Сан» (Россия) и “Orion Pharma” (Финляндия). Панель для определения цитокинов (Bio-Plex Pro™ Mouse Cytokine Th17 Panel A 6-Plex #M6000007NY). Все остальные реагенты были приобретены в “Sigma-Aldrich” (“Merck”, США).

Исследуемые синтетические производные динорфина, а именно гексапептид Tyr-D-Ala-Gly-Phe-Leu-Arg в форме диацетата (здесь и далее YdAGFLR), был приобретен в ООО «Бион» (Россия). Гептапептид Tyr-D-Ala-Gly-Phe-Leu-Arg-Arg-NH₂ в форме диацетата (здесь и далее YdAGFLRR-NH₂), был синтезирован в Научном центре биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства (ФГБУН НЦБМТ ФМБА России).

2.2. Животные

Исследования проводились на мышах линии C57Bl/6Y, в возрасте около 2,5 мес., с начальной средней массой 20±2,0 г. в ФГБУН НЦБМТ ФМБА России. Животные были получены из филиала «Столбовая» ФГБУН НЦБМТ ФМБА России. Длительность карантина для всех животных составляла 7 дней. В течение карантина проводили ежедневный осмотр каждого животного (поведение и общее состояние), дважды в день мышей наблюдали в клетках (заболеваемость и смертность). Перед началом исследования животные, отвечающие критериям

включения в эксперимент, были распределены на группы путем рандомизации. Животные, не соответствующие критериям, исключались из эксперимента в течение карантина.

Мыши содержались в вентилируемых клетках RairIsoSystem, группами по 5 особей в клетке. В качестве подстилки использовали стерильные древесные опилки, в качестве корма – стандартный комбикорм гранулированный полнорационный для лабораторных животных (экструдированный) ПК-120 ГОСТ Р 51849-2001 Р.5. Кормление животных осуществлялось по нормативам в соответствии с видом животных. Водопроводная очищенная вода всем животным давалась *ad libitum* в стандартных поилках. Животные содержались в контролируемых условиях окружающей среды: температура воздуха 18-22°C и относительная влажность 60-70%. В комнатах содержания животных поддерживался 12-часовой цикл освещения.

Маркировка клетки кодировала пол животных, линию, дату начала введения препаратов, название группы. Каждому отобранному в исследование животному был присвоен индивидуальный номер. Животных маркировали с помощью меток на хвосте.

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:

- ГОСТ Р-53434-2009 «Принципы надлежащей лабораторной практики»;
- Приказ Министерства здравоохранения и социального развития РФ от 01 апреля 2016 г. № 199н «Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики»;
- Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ – 2-изд. – М.: ОАО «Издательство «Медицина», 2005. – 832 с.;

- Руководство по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских исследованиях / под ред. Н.Н. Каркищенко, С.В. Грачева. М.: Профиль–2С, 2010, 358 с.

2.3. Методы исследований

2.3.1. Моделирование острого воспаления легких у мышей C57Bl/6Y

Острое воспалительное повреждение легких у мышей C57Bl/6Y моделировали последовательным введением α -GalCer, ингаляционно в дозе 1 мкг/мышь, и через 24 ч – комбинации липополисахарид *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 («Ари-Сан», 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 (Рисунок 6), как детально описано в [187].

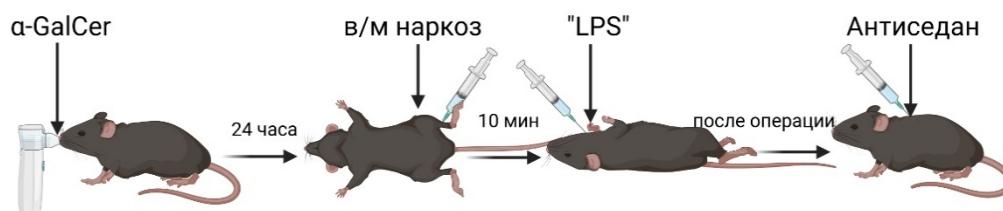


Рисунок 6 – Схема моделирование острого воспаления легких у мышей C57Bl/6Y

2.3.2. Ингаляционная система

Ингаляционное введение растворов препаратов в форме аэрозоля проводилось с использованием компрессорного ингалятора OMRON COMP AIR NE-C24 Kids с заданными характеристиками (средний размер частиц – приблизительно 3 мкм, производительность – около 0,3 мл/мин), снабженного насадкой на ингалятор, разработанной в НЦБМТ ФМБА России и позволяющей проводить ингаляцию одновременно нескольким животным с равной дозой нагрузки благодаря расположению фиксаторов на одинаковом расстоянии от источника подачи аэрозоля (Рисунок 7).

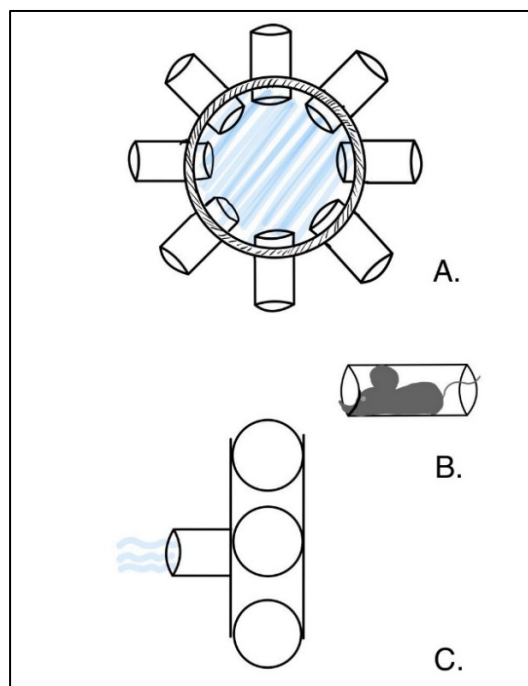


Рисунок 7 - Схематичное изображение ингаляционной камеры: А. – вид сверху, В. – нос мыши располагается внутри резервуара с подачей лекарственного средства, С. – вид сбоку

Каждая мышь помещается в отдельный фиксатор таким образом, чтобы в общий резервуар попадала только носовая часть мордочки. Одна сессия ингаляции по времени проводилась из расчета объема раствора препарата, залитого в резервуар, и производительности прибора (0,3 мл/мин.).

2.3.3. Измерение концентраций гексапептида YdAGFLRY в крови и легких мышей C57Bl/6Y методом ВЭЖХ-МС

Образцы крови и ткани легких после однократного ингаляционного введения гексапептида YdAGFLR с использованием ингаляционной системы п. 2.3.2 отбирались в следующих временных точках: 0 (до введения препарата); 2,5; 5; 10; 20; 15; 30; 60; 120 мин, по 6 животных в каждой точке.

Отбор крови проводился под наркозом из заглазничного синуса в объеме около 1 мл в пробирки типа Eppendorf с соответствующей маркировкой, содержащей порядковый номер точки и животного. Ткани легкого целиком извлекались у животного постмортально и переносились в пробирки типа Eppendorf с аналогичной маркировкой.

Пробоподготовка проводилась следующим образом: образец легких мыши массой 300 мг отбирали в специальные пробирки с пластиковыми шариками. К навеске добавляли 600 мкл 90% ацетонитрила. Образцы гомогенизировали с использованием MagNA Lyser (“Roche”, Швейцария) в течение 20 с при 7000 об., не допуская перегрева образцов. Добавляли 400 мкл ацетонитрила и центрифугировали при 13500 об./мин в течение 5 мин при 4°C. Надосадочную жидкость, полученную из ткани легких, вносили на планшет Captiva ND 96-well. При исследовании образца сыворотки крови в планшет заранее добавляли 800 мкл ацетонитрила и наносили образец объемом 0,2 см³. Далее, следуя протоколу, производили фильтрацию раствора в течение 10 мин, осаждая белки сыворотки крови и легких на картридже под вакуумом. Полученный фильтрат переносили в пробирки объемом 1,5 мл. Упаривали на концентраторе при 1500 об./мин, температуре 45°C в течение 45 мин, с последующим восстановлением сухого остатка в 200 мкл ацетонитрила. После этого полученный раствор переносили на планшет Captiva ND 96-well. В ВЭЖХ-МС анализ вводили 0,002 см³ фильтрата.

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, оснащенный 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. Масс-спектр и типичный вид хроматограммы гексапептида приведены на Рисунке 8.

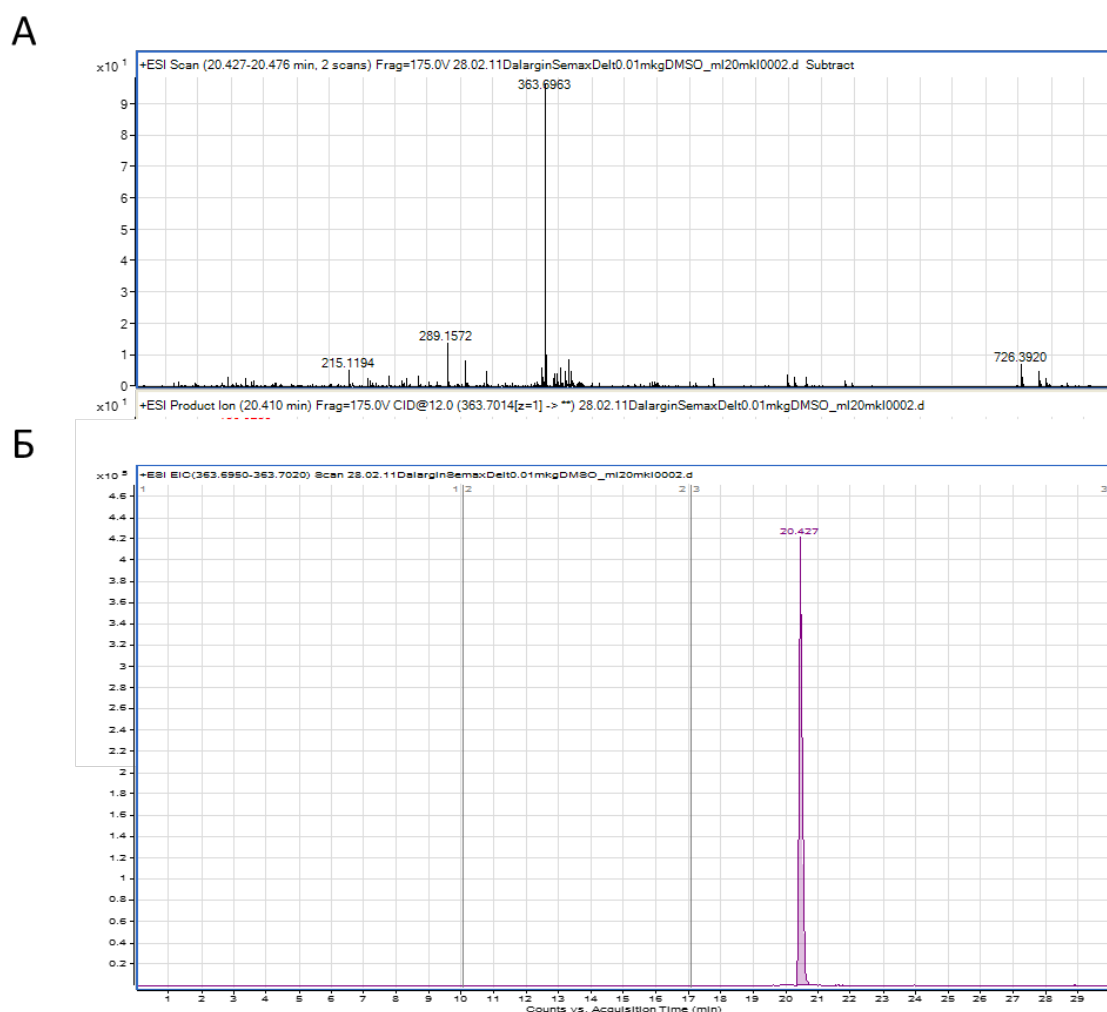


Рисунок 8 – А) Масс-спектр и Б) Масс-хроматограмма гексапептида YdAGFLR

Идентификация аналита проводилась по времени хроматографического удерживания и масс-спектрометрическим характеристикам. Критерием надежной идентификации являлось детектирование сигнала с соотношением сигнал/шум не менее 5/1 при времени удерживания, совпадающем в пределах 0,1 мин со временем удерживания, установленным для гексапептида в образцах для градуировки. Для

надежной идентификации требовалось, чтобы в масс-спектре присутствовали все пики, имеющиеся в масс-спектре аутентичного соединения, с относительной интенсивностью 10% и более. При этом максимальное расхождение в значениях относительных интенсивностей ионов в анализируемом и справочном масс-спектрах не должно было превышать 20%.

2.3.4. Изучение экспрессии генов сиртуинов 1-7 в легких мышей C57Bl/6Y методом ПЦР в реальном времени

После индукции острого воспаления легких у мышей C57BL/6Y, как детально описано в п. 2.3.1, животных рандомизировали в три группы по 6 животных в каждой. В контрольной группе животные через 30 мин после введения LPS получили 100 мкл физ. раствора однократной ингаляцией. В опытных группах животные получили 0,1 мг/кг гексапептида YdAGFLR или гептапептида YdAGFLRR-NH₂ в виде 100 мкл раствора с концентрацией 0,02 мкг/мл. Через 30 мин после введения препаратов животные были выведены из эксперимента. Образцы ткани легких, извлеченные после эвтаназии животных, помещались в пробирку типа Eppendorf объемом 2 мл для ПЦР анализа (Рисунок 9).



Рисунок 9 – Схема исследования

Общую РНК экстрагировали из образцов лёгких с помощью набора «РНК-экстран» («Синтол», Россия) и переводили в комплементарную ДНК с помощью набора «РЕВЕРТА-Л» («АмплиСенс», Россия) в соответствии с инструкциями

производителей. Уровни мРНК сиртуинов 1-7 в исследуемых пробах определяли с помощью амплификатора CFX-96 («Bio-Rad», США) с использованием специфических праймеров и флуоресцентных зондов (Таблица 4).

Таблица 4 - Олигонуклеотидные праймеры и зонды

Ген	Праймеры и зонды
<i>Sirt1</i>	F: 5'- TCCTTGGAGACTGCGATGTT-3' R: 5'- ATGAAGAGGTGTTGGTGGCA-3' Z: ROX - TGAGTTGTGTCATAGGCTAGGTGGT-BHQ2
<i>Sirt2</i>	F: 5'- GGCTCAGGATTCAGACTCGG-3' R: 5'- CTCCCACCAAACAGATGACC-3' Z: ROX - GTGGAGAGGCAGAGATGGACTTCCT-BHQ2
<i>Sirt3</i>	F: 5'- TATGGGCTGATGTGATGGCG-3' R: 5'- GAGGACTCAGAACGAACGGC-3' Z: ROX - TACTGGCGTTGTGAAACCCGACATT-BHQ2
<i>Sirt4</i>	F: 5'- GCACTCTGATGTCCAAAGGC-3' R: 5'- TTACCAGAAGGCGACACAGC-3' Z: ROX - CAATGCCGCTCCAACCTCTGAATCCT-BHQ2
<i>Sirt5</i>	F: 5'- CGAACGCCAAGCACATAGCC-3' R: 5'- GGTTGGGTTCTTTGCTCCGC-3' Z: ROX - CGCTGGAGGTTACTGGAGAAAATGG-BHQ2
<i>Sirt6</i>	F: 5'-TGGACTGGGAGGACTCGTTG-3 R: 5'- GTTGACAATGACCAGACGGC-3 Z: ROX - CGGGACCTGATGCTCGCTGATGAGG-BHQ2
<i>Sirt7</i>	5'- CAGGAGGAGGTGTGTGATGA-3 5'- CTAGGTCGGCAGCACTCAC-3 ROX - AGGCACTTGGTTGTCTACACGGGCG-BHQ2

В качестве референсного гена для нормирования первичных данных результатов был выбран ген домашнего хозяйства GADPDH. Результаты представляли как кратное изменение уровней мРНК целевого гена через 30 мин после введения препаратов относительно соответствующего среднего значения у интактных животных.

2.3.5. Изучение динамики транскрипции генов в легких мышей C57Bl/6Y с острым воспалением легких после однократного ингаляционного введения гексапептида YdAGFLR методом ПЦР в реальном времени

После индукции острого воспаления легких у мышей C57BL/6Y, как детально описано в п. 2.3.1, животных рандомизировали в две группы по 75 животных в каждой. В контрольной группе животные через 30 мин после введения LPS получили 100 мкл физ. раствора однократной ингаляцией, в опытной группе – 0,1 мг/кг гексапептида YdAGFLR в виде 100 мкл раствора с концентрацией 0,02 мкг/мл. По пять животных из каждой группы выводились из эксперимента в следующих временных точках: 0,25; 0,5; 0,75; 1,0; 1,5; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0; 6,0; 12,0; 18,0; 24,0; 48,0 и 72,0 ч после введения препаратов (Рисунок 10).

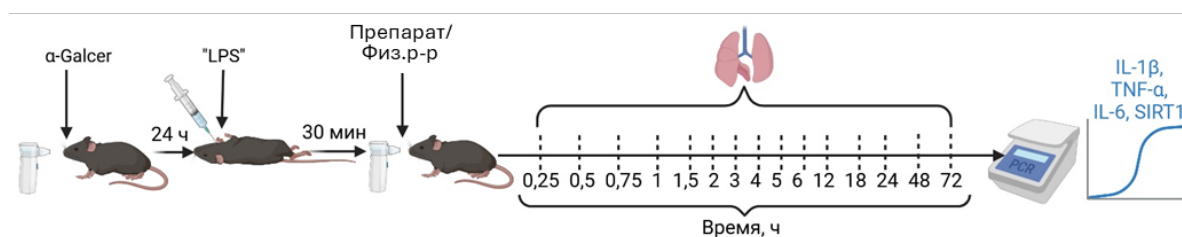


Рисунок 10 - Схема исследования

Образцы тканей легких, извлеченные после эвтаназии животных, помещались в 2 мл пробирки типа Eppendorf. Общую РНК экстрагировали из образцов легких с помощью набора «РНК-экстран» («Синтол», Россия) и переводили в комплементарную ДНК с помощью набора «РЕВЕРТА-Л» («АмплиСенс», Россия) в соответствии с инструкциями производителей. Уровни мРНК IL-1β, TNF-α, IL-6 и SIRT1 в исследуемых пробах определялись с помощью амплификатора CFX-96 («Bio-Rad», США) с использованием специфических праймеров и флуоресцентных зондов, указанных в Таблице 5.

Таблица 5 - Олигонуклеотидные праймеры и зонды

Ген	Праймеры и зонды
<i>Ili1b</i>	F: 5'-GAG AAC CAA GCA ACG ACA AA-3' R: 5'-CTT GTT GAA GAC AAA CCG TT-3' Z: ROX-TAA TGA AAG ACG GCA CAC CCA CCC T-BHQ2
<i>Tnfa</i>	F: 5'-TCT GTC TCT CAC CTG CTC TG-3' R: 5'-GGT TCT CAG ATG TGT CAC GA-3' Z: ROX-GAA TGG ATG GGC TAC ATA AGT TAC G-BHQ2
<i>Il6</i>	F: 5'-ATG AAG TTC CTC TCT GCA AG-3' R: 5'-GTG TAA TTA AGC CTC CGA CT-3' Z: ROX-CTT CTT GGG ACT GAT GCT GGT GAC A-BHQ-2
<i>Sirt1</i>	F: 5'-TCC TTG GAG ACT GCG ATG TT-3' R: 5'-ATG AAG AGG TGT TGG TGG CA-3' Z: ROX-TGA GTT GTG TCA TAG GCT AGG TGG T-BHQ2

В качестве референсного гена для нормирования первичных данных результатов был выбран ген домашнего хозяйства GAPDH. Результаты представляли в виде среднего значения уровня экспрессии мРНК целевого гена, рассчитанного путем деления индивидуального уровня мРНК у мышей, получавших препарат или физиологический раствор, на средний уровень мРНК у интактных мышей (n = 5).

2.3.6. Анализ цитокинов IL-1 β , IL-6 и TNF- α в бронхоальвеолярном лаваже из легких мышей C57Bl/6Y с острым воспалением легких после однократного ингаляционного введения гексапептида YdAGFLR

После индукции острого воспаления легких у мышей C57BL/6Y, как детально описано в п. 2.3.1, животных рандомизировали в две группы по 48 особей в каждой. В контрольной группе животные через 30 мин после введения LPS получили 100 мкл физ. раствора однократной ингаляцией, а в опытной – 0,1 мг/кг гексапептида YdAGFLR в виде 100 мкл раствора с концентрацией 0,02 мг/мл. По три животных из каждой группы выводилось из эксперимента в следующих

временных точках: 0,25; 0,5; 0,75; 1; 1,5; 2; 3; 4; 5; 6 часов, а также по шесть животных – во временных точках 18, 48 и 72 часа после введения препаратов.

Образцы бронхоальвеолярного лаважа (БАЛ) получали следующим образом: после разреза трахеи под наркозом вводили пластиковую канюлю, и воздушные пространства промывали 1,0 мл физиологического раствора (4 раза по 0,25 мл). Затем образцы БАЛ центрифугировали ($1000 \times g$ в течение 5 мин) при комнатной температуре, и собирали надосадочную жидкость. Содержание белка определяли методом Брэдфорда. Образцы разливали по аликвотам и хранили при -80°C до проведения дальнейших исследований. Уровни белков цитокинов определяли в образцах БАЛ. Измерения проводились на мультиплексном ридере Bio-Plex®MAGPIX™ Multiplex Reader («Bio-Rad» SN: 12250707) с использованием стандартной коммерчески доступной панели (Bio-Plex Pro™ 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).

2.4. Статистический анализ

Данные представлены как среднее \pm стандартная ошибка среднего. Были использованы следующие обозначения: M — среднее, m — стандартная ошибка среднего, SD — стандартное отклонение, CV — коэффициент вариации, рассчитанный как отношение стандартного отклонения к среднему значению, n — объём выборки, p — достигнутый уровень значимости. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$. Для выбора параметрических или непараметрических методов статистического анализа использовали критерий 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 GraphPad Prism v.8.3.0 (San Diego, США). Для множественных сравнений между группами использовали апостериорный тест Даннетта или Сидака. Применение того или иного метода статистического анализа данных отдельных экспериментов указано для каждого такого эксперимента в главе 3 настоящей работы.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ

3.1. Валидация ингаляционного способа введения с использованием аэрозольной камеры

Ингаляционный способ введения лекарственных препаратов мышам для оценки эффективности исследуемого вещества и дальнейшей экстраполяции полученных данных на человека имеет ряд особенностей. Мыши имеют физиологическое расхождение в системе дыхания с человеком, а именно облигатное носовое дыхание, в то время как человек может дышать и ртом, и носом. При работе с мышами отсутствует возможность объективно проверить факт вдыхания животными исследуемого препарата. Кроме того, эффективность доставки препарата при ингаляционном введении прямо зависит от конструкции аэрозольной камеры, используемой для такого введения.

В этом разделе представлены результаты исследований, подтверждающие достижение терапевтического эффекта при ингаляционном способе введения пептидного препарата мышам с использованием аэрозольной камеры из п. 2.3.2 настоящей работы.

3.1.1. Валидация ингаляционного способа введения гексапептида YdAGFLR с использованием аэрозольной камеры

Для того, чтобы подтвердить, что ингаляционное введение гексапептида YdAGFLR с использованием аэрозольной камеры из п. 2.3.2 обеспечивает заявленный терапевтический эффект, а именно повышает транскрипцию гена сиртуина 1 в легких мышей C57Bl/6Y в условиях моделирования острого воспаления легких [17], мышам вводили однократно гексапептид (n=6) или физ. раствор (n=6) и определяли уровни мРНК SIRT1 в ткани легких как описано в п.

2.3.4. Гексапептид при ингаляционном введении с использованием ингаляционной камеры п. 2.3.2 многократно и статистически значимо повысил экспрессию мРНК SIRT1 в легких ($p < 0,05$; непарный двусторонний *t*-тест Стьюдента) по сравнению с контролем (Рисунок 11).

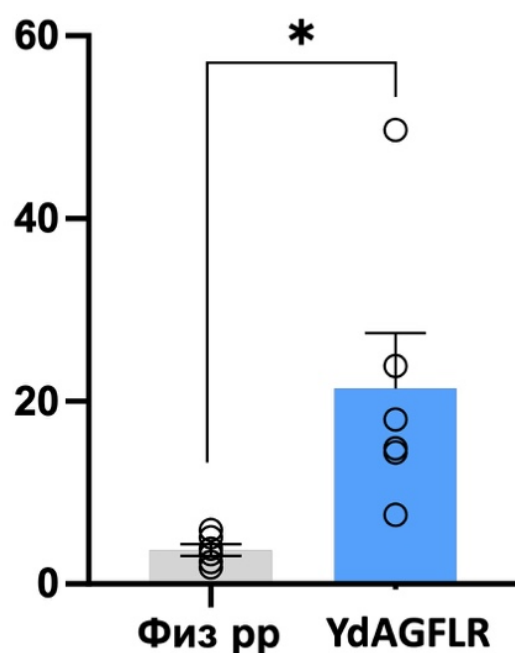


Рисунок 11 - Эффект ингаляционного введения гексапептида YdAGFLR на уровни мРНК SIRT1 в легких мышей C57BL/6Y с острым воспалением легких

Таким образом, ингаляционное введение гексапептида YdAGFLR обеспечивает заявленный терапевтический эффект и, тем самым, подтверждает принципиальную возможность исследования механизмов противовоспалительного действия пептидов на мышах при этом способе введения с использованием аэрозольной камеры, описанной в п. 2.3.2.

3.1.2. Изучение распределения гексапептида YdAGFLR в легких и крови мышей C57BL/6Y после однократного ингаляционного введения с использованием аэрозольной камеры

Для того, чтобы изучить распределение гексапептида YdAGFLR в легких и крови, гексапептид в дозе 150 мг/кг вводился в ингаляционно однократно мышам C57BL/6Y (n=6) с использованием аэрозольной камеры из п. 2.3.2. Динамика изменений концентраций гексапептида в ткани легкого показана в Таблице 6.

Таблица 6 - Динамика изменений концентраций гексапептида YdAGFLR в лёгких мышей после однократного ингаляционного введения в дозе 150 мг/кг.

Мышь, №	Концентрация, нг/г								
	0'	2,5'	5'	10'	15'	20'	30'	60'	120'
1	0,00	78,65	205,4 5	644,7 1	41,97	30,14	28,92	12,45	6,87
2	0,00	76,39	177,6 1	48,02	73,21	43,54	23,93	13,67	6,07
3	0,00	65,85	223,4 7	384,3 9	85,75	34,89	30,87	7,95	8,05
4	0,00	85,31	143,7 1	299,6 7	103,2 5	32,65	40,75	14,10	5,48
5	0,00	71,33	199,4 9	419,5 5	94,77	29,34	19,87	13,20	9,34
6	0,00	63,63	212,5 9	354,7 4	81,33	14,17	27,41	12,01	5,95
M	0,00	73,53	193,7 2	358,5 0	80,05	30,79	28,62	12,23	6,96
SD	0,00	6,59	22,04	124,3 8	14,97	6,24	4,89	1,50	1,16
CV, %	0,00	8,97	11,38	34,70	18,70	20,26	17,08	12,28	16,61
Примечание: ' — время в минутах.									

Динамика изменений концентраций гексапептида YdAGFLR в сыворотке крови представлена в Таблице 7.

Таблица 7 - Динамика изменений концентраций гексапептида YdAGFLR в сыворотке крови мышей после однократного ингаляционного введения в дозе 150 мг/кг.

Мышь, №	Концентрация, нг/мл								
	0,0'	2,5'	5'	10'	15'	20'	30'	60'	120'
1	0,00	21,91	35,78	22,72	15,54	31,11	64,14	21,57	7,36
2	0,00	19,69	70,60	18,18	12,25	48,47	42,09	18,21	12,22
3	0,00	38,62	53,19	17,74	13,66	25,88	35,93	20,53	9,11
4	0,00	26,48	60,52	23,13	16,78	31,79	71,12	17,98	8,31
5	0,00	18,39	45,78	20,83	10,56	28,56	55,90	18,61	11,12
6	0,00	25,54	53,17	20,49	13,76	33,16	53,84	19,37	9,62
M	0,00	25,11	53,17	20,52	13,76	33,16	53,84	19,38	9,62
SD	0,00	5,11	8,26	1,71	1,60	5,10	9,88	1,11	1,36
CV, %	0,00	20,35	15,54	8,34	11,65	15,39	18,36	5,75	14,16

Примечание: ' — время в минутах.

Динамика изменений концентраций гексапептида YdAGFLR в ткани легкого и сыворотке крови показаны на Рисунке 12.

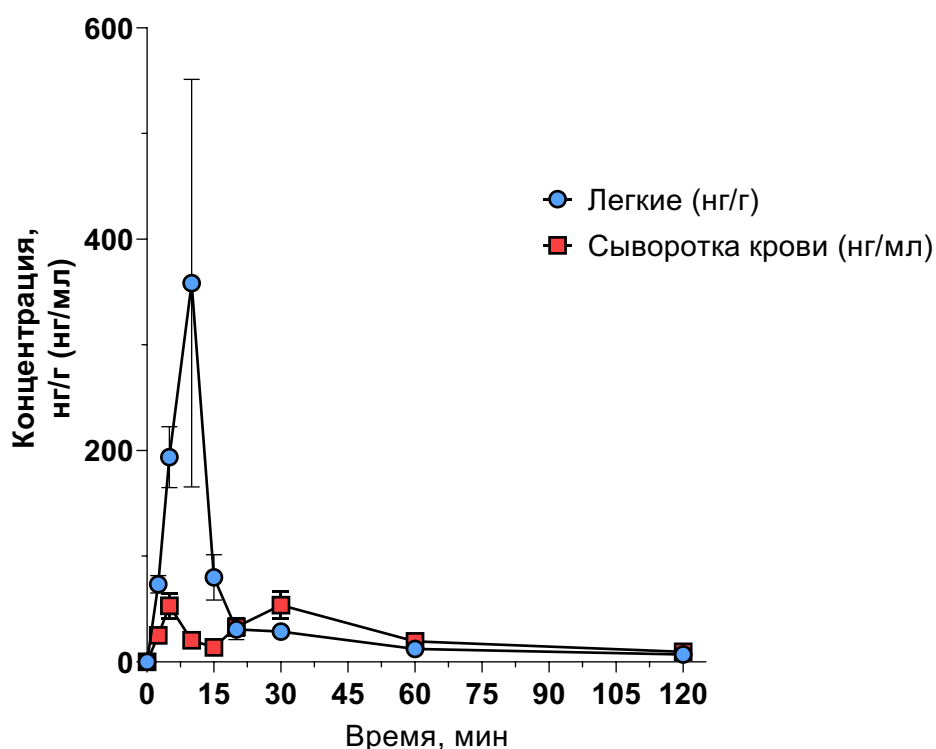


Рисунок 12 - Динамика изменений концентраций гексапептида YdAGFLR в легких (●) и сыворотке крови (■) после однократного ингаляционного введения мышам C57Bl/6Y в дозе 150 мг/кг

Основные фармакокинетические параметры распределения гексапептида YdAGFLR в ткани легкого и сыворотке крови при однократном ингаляционном введении с использованием аэрозольной камеры из п. 2.3.2 показаны в Таблице 8.

Таблица 8 - Фармакокинетические параметры гексапептида YdAGFLR в сыворотке крови и легких мышей 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.

Представленные результаты показывают, что ингаляционное введение обеспечивает преимущественное повышение как максимальной концентрации C_{\max} , так и площади под кривой $AUC_{0 \rightarrow t}$ для гексапептида в легких по сравнению с сывороткой крови, причем C_{\max} в лёгких составила 358,5 нг/г, что более чем в 6 раз превышает C_{\max} в крови 53,84 нг/мл. Скорости всасывания гексапептида (C_{\max}/AUC) при ингаляционном введении в ткани легкого выше, чем в крови. Время достижения максимальной концентрации T_{\max} гексапептида в сыворотке крови и легких составляет 30 и 10 мин, соответственно. Таким образом, сравнение фармакокинетических параметров показывает, что ткань легкого является основной зоной действия гексапептида при ингаляционном введении.

В целом, результаты, полученные в разделах 3.1.1 и 3.1.2, являются обоснованием для выбора ткани легкого в качестве основного объекта исследования механизмов противовоспалительного действия синтетических производных динорфинов на мышинной модели острого воспаления легких при

ингаляционном введении с использованием аэрозольной камеры, описанной в п. 2.3.2 настоящей работы.

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

Опираясь на данные научной литературы [10-14], указывающие на то, что основными эндогенными динорфинами, проявляющими противовоспалительную активность в очаге воспаления являются DYN 1-6 и DYN 1-7 для исследования механизма противовоспалительного действия были выбраны их стабилизированные к действию аминокептидаз синтетические производные, а именно гексапептид YdAGFLR, аналог эндогенного DYN 1-6, и амид гептапептида YdAGFLRR-NH₂, аналог эндогенного DYN 1-7. Синтетический гексапептид YdAGFLR был выбран еще и потому, что противовоспалительные эффекты этого пептида наиболее широко изучены, а сам пептид уже введен в клиническую практику.

3.2.1. Исследование транскрипции сиртуинов 1-7 в легких интактных мышей C57Bl6/Y

На первом этапе оценивали уровни транскрипции генов всех семи известных индивидуальных сиртуинов млекопитающих 1 – 7 у интактных животных (Рисунок 13).

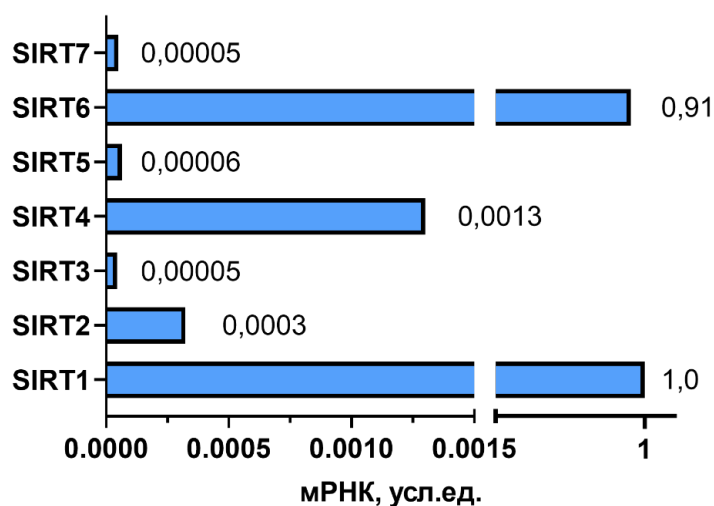


Рисунок 13 - Среднее содержание мРНК сиртуинов 1-7 в легких интактных мышей C57Bl/6Y (n=3) по данным анализа ПЦР в реальном времени. Уровень экспрессии мРНК SIRT1 условно принят за 1,0

ПЦР анализ в реальном времени показывает, что транскриптом сиртуинов в легких здоровых интактных мышей представлен преимущественно двумя ядерными сиртуинами SIRT1 и SIRT6, так как абсолютные уровни мРНК этих сиртуинов на три-пять порядков превышают уровни мРНК остальных сиртуинов 2, 3, 4, 5 и 7.

На втором этапе, для того, чтобы оценить влияние синтетических производных динорфина на транскрипцию генов сиртуинов 1 – 7 в условиях моделирования острого воспаления легких на мышах C57Bl/6Y, мышам ингаляционно однократно вводили гексапептид YdAGFLR или амид гептапептида YdAGFLRR-NH₂ и оценивали уровни транскрипции *Sirt1-7* путем измерения уровней мРНК сиртуинов 1-7 в ткани легкого методом ПЦР в реальном времени с использованием соответствующих праймеров и зондов, как описано в п. 2.3.4.

3.2.2. Исследование влияния гексапептида YdAGFLR на транскрипцию сиртуинов 1-7 в легких мышей C57Bl/6Y в условиях острого воспаления

Интратрахеальное введение LPS ведет к повышению в легких уровней мРНК всех семи членов класса сиртуинов относительно уровней, наблюдаемых у интактных животных. Содержание мРНК основных ядерных сиртуинов SIRT1 и SIRT6 повышается в 3,7 и 1,7 раза, а уровни мРНК минорных сиртуинов SIRT2, SIRT3, SIRT4, SIRT5 и SIRT7 повышаются в 36, 40, 56, 3 и 1,7 раза, соответственно.

Ингаляционное введение гексапептида YdAGFLR животным, индуцированным LPS, вызывает статистически значимое повышение в легких уровней мРНК SIRT1 в 5,7 раза ($p < 0,01$; Рисунок 14Б), SIRT2 в 16 раз ($p < 0,01$; Рисунок 14В), SIRT3 в 23 раза ($p < 0,01$; Рисунок 14Г), SIRT5 в 4,7 раза ($p < 0,01$; Рисунок 14Е), SIRT6 в 6,4 раза ($p < 0,01$; Рисунок 14Ж) и SIRT7 в 19,9 раза ($p < 0,01$; Рисунок 14З) по сравнению с соответствующими уровнями мРНК у животных с острым воспалением легких, получавших ингаляционно физ. раствор. При этом, гексапептид YdAGFLR не имел статистически значимого влияния на транскрипцию гена SIRT4 ($p = 0,937$; Рисунок 14Д) в легких по сравнению с контролем.

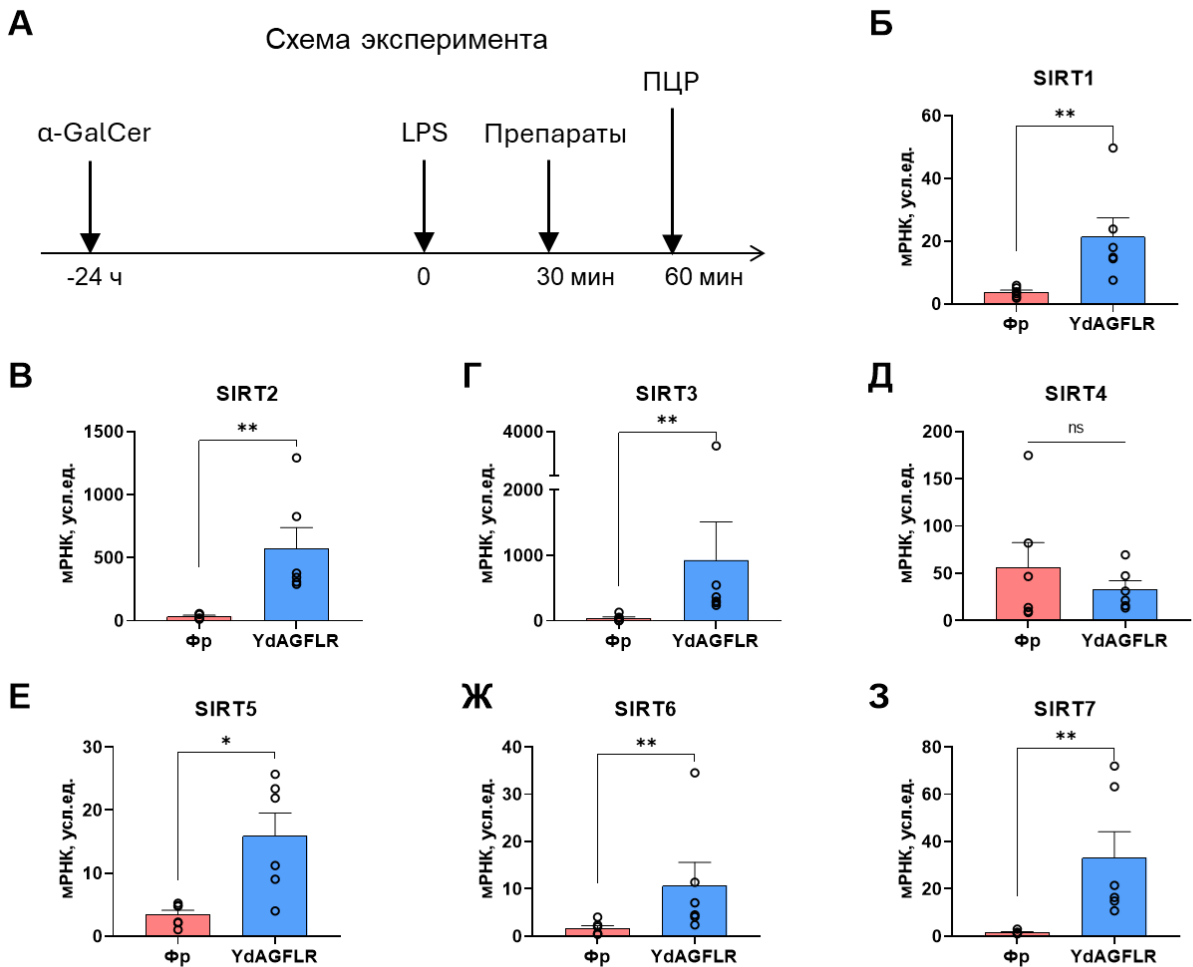


Рисунок 14 - Эффект гексапептида YdAGFLR на транскрипцию сиртуинов в легких мышей C57Bl/6Y с острым воспалением легких, индуцированным LPS. Схема эксперимента (А). Уровни мРНК SIRT1 (Б), SIRT2 (В), SIRT3 (Г), SIRT4 (Д), SIRT5 (Е), SIRT6 (Ж) и SIRT7 (З) в легких животных, индуцированных LPS и получавших ингаляционно гексапептид (YdAGFLR) или физ. раствор (Фр). За одну условную единицу 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 контролем (тест Манна-Уитни)

Таким образом, ингаляционное введение гексапептида YdAGFLR статистически значимо повышает транскрипцию генов ядерных сиртуинов SIRT1, SIRT6 и SIRT7, цитозольного сиртуина SIRT2, а также митохондриальных сиртуинов SIRT3 и SIRT5 в легких мышей C57BL/6Y в условиях моделирования острого воспаления легких.

3.2.3. Исследование влияния гептапептида YdAGFLRR-NH₂ на транскрипцию сиртуинов 1-7 в легких мышей C57Bl/6Y в условиях острого воспаления

Эффект гептапептида YdAGFLRR-NH₂ на транскрипцию сиртуинов в легких мышей C57Bl/6Y с острым воспалением легких показан на Рисунке 15.

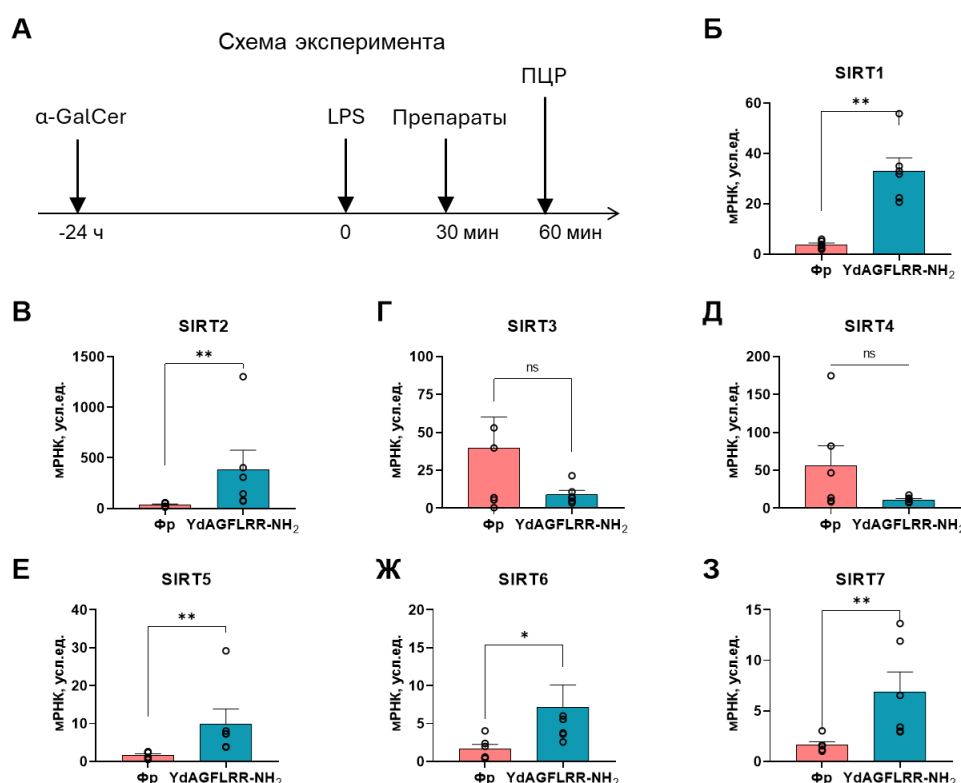


Рисунок 15 - Эффект гептапептида YdAGFLRR-NH₂ на транскрипцию сиртуинов в легких мышей C57Bl/6Y с острым воспалением легких, индуцированным LPS. (А) Схема эксперимента. (Б, В, Г, Д, Е, Ж, З) Уровни мРНК SIRT1, SIRT2, SIRT3, SIRT4, SIRT5, SIRT6 и SIRT7, соответственно, в легких животных, индуцированных LPS и получавших ингаляционно гептапептид (YdAGFLRR-NH₂) или физ. раствор (Фр). За одну усл. единицу принято среднее значение уровней мРНК соответствующих сиртуинов у интактных животных. M±m (n=6). ns—p≥0,05; *—p<0,05; **—p<0,01 по сравнению с контролем (тест Манна-Уитни)

Ингаляционное введение гептапептида YdAGFLRR-NH₂ мышам C57Bl/6Y с индуцированным острым воспалением легких вызывает статистически значимое повышение в легких уровней мРНК SIRT1 в 9,1 раза (p<0,01; Рисунок 15Б), SIRT2

в 6,1 раза ($p < 0,01$; Рисунок 15В), SIRT5 в 4,2 раза ($p < 0,01$; Рисунок 15Е), SIRT6 в 3,6 раза ($p < 0,05$; Рисунок 15Ж) и SIRT7 в 3,2 раза ($p < 0,01$; Рисунок 15З) по сравнению с соответствующими уровнями мРНК у контрольных животных, получавших ингаляционно физ. раствор. При этом, амид гептапептида не влиял статистически значимо на транскрипцию генов SIRT3 ($p = 0,4848$; Рисунок 15Г) и SIRT4 ($p = 0,093$; Рисунок 15Д).

Таким образом, ингаляционное введение амида гептапептида YdAGFLRR-NH₂ статистически значимо повышает транскрипцию генов ядерных сиртуинов SIRT1, SIRT6 и SIRT7, цитозольного сиртуина SIRT2, а также митохондриального сиртуина SIRT5 в легких мышей C57BL/6Y в условиях моделирования острого воспаления легких.

3.3. 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

Согласно гипотезе Kauppinen и др. [173], физиологический механизм разрешения воспаления может быть связан с тем, что в ответ на провоспалительные стимулы активация транскрипционного фактора NF- κ B запускает транскрипцию генов, кодирующих не только провоспалительные цитокины, но и противовоспалительный сиртуин 1, который также относится к целевым генам, но который снижает транскрипционную активность NF- κ B и приводит к разрешению воспаления. Для того, чтобы уточнить, имеет ли место подобный механизм при моделировании острого воспаления легких, мышам C57Bl/6Y индуцировали воспаление легких введением LPS, как детально описано в п. 2.3.1 и изучали динамику изменений уровней мРНК IL-1 β , TNF- α , IL-6 и SIRT1 в течение 72 часов.

Введение LPS вызывает осцилляции уровней мРНК цитокинов и SIRT1 в легких в течение 72 ч после индукции воспаления, причем статистически значимое повышение амплитуды уровней мРНК относительно исходных значений,

наблюдаемых до индукции воспаления, происходит синхронно во временной точке 5 часов после индукции воспаления как для цитокинов, так и для SIRT1 (Рисунок 16).

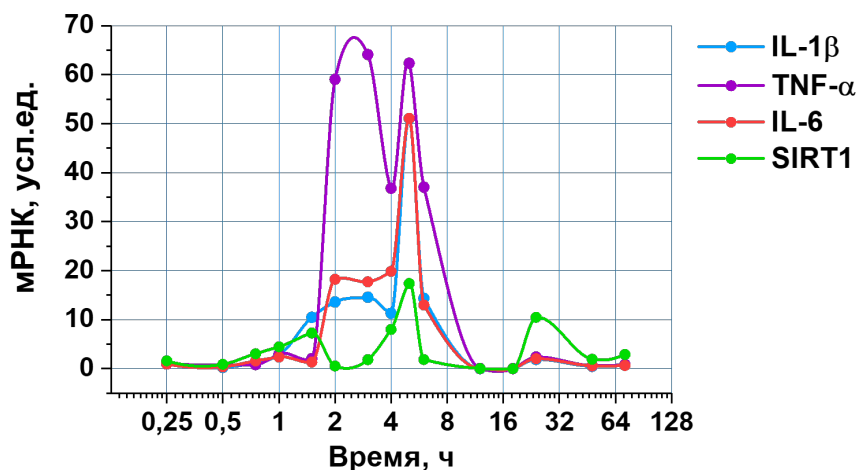


Рисунок 16 - Профили мРНК IL-1 β , TNF- α , IL-6 и SIRT1 в тканях легких мышей C57BL/6Y с острым воспалением легких в интервале 0,25-72 ч. Примечание: символы — $M \pm m$ ($n=5$) экспериментальных значений в указанных временных точках; линии — интерполяция сплайнами Акима. Одна усл. единица – средний уровень мРНК у интактных животных

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. Апостериорный тест Даннетта показал статистически значимое 50- и 60-кратное пиковое повышение уровней мРНК IL-1 β ($p<0,0001$), IL-6 ($p<0,0001$) и TNF- α ($p<0,0001$) во временной точке 5 часов относительно соответствующих исходных значений во временной точке 0,25 ч. Статистически значимое 17- и 10-кратное повышение уровней мРНК SIRT1 наблюдалось во временных точках 5 ч ($p<0,0001$) и 24 ч ($p<0,01$). Высокие уровни TNF- α наблюдались уже в интервале от 2 до 3 ч, что указывает на лидирующую роль TNF- α в раннем периоде воспаления. Однократное введение LPS вызывает осцилляцию уровней мРНК SIRT1 с тремя выраженными пиками, причем статистически значимое повышение мРНК наблюдается во временных точках 5 и 24 ч. Следует отметить, что во временной точке 24 ч, когда наблюдается пик

транскрипции гена SIRT1, транскрипция провоспалительных цитокинов практически прекращается, что согласуется с гипотезой [169] о роли SIRT1 как факторе терминирующем воспаление.

Для того, чтобы оценить влияние гексапептида YdAGFLR на динамику транскрипции генов IL-1 β , TNF- α , IL-6 и SIRT1 в легких, гексапептид или физ. раствор (контроль) вводили однократно ингаляционно с использованием аэрозольной камеры из п. 2.3.2 в легкие мышей C57Bl/6Y с воспалением легких, индуцированным LPS, после чего измеряли уровни мРНК IL-1 β , TNF- α , IL-6 и SIRT1 в легких в течение 72 часов (Рисунки 17, 18, 19 и 20).

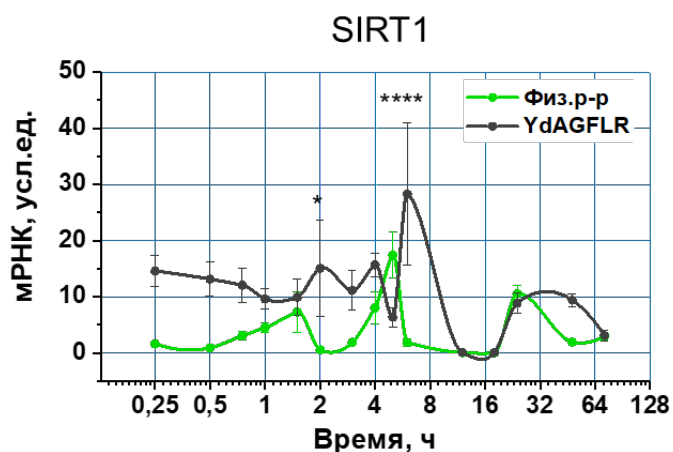


Рисунок 17 - Эффект однократного ингаляционного введения YdAGFLR на уровни мРНК SIRT1 в легких мышей C57Bl/6 с острым воспалением легких, индуцированным LPS, в интервале наблюдений 0,25-72 ч, в сравнении с контролем (Физ. раствор). Символы — $M \pm m$ ($n=5$) экспериментальных значений в указанных временных точках; линии — интерполяция сплайнами Акима; *— $p < 0,05$, ****— $p < 0,0001$ по сравнению с контролем (тест Сидака). Одна усл. единица – средний уровень мРНК у интактных животных

Двухфакторный дисперсионный анализ (two-way ANOVA) выявил статистически значимый основной эффект YdAGFLR на уровни мРНК SIRT1 ($F_{1,120}=27,41$; $p < 0,0001$; Рисунок 17), а также статистически значимый основной эффект фактора времени ($F_{14,120}=3,125$; $p=0,0004$) и значимое взаимодействие препарата и времени ($F_{14,120}=3,526$; $p < 0,0001$). Наличие основного эффекта времени указывает на значительные изменения уровней (осцилляции) мРНК в разные моменты времени в каждой из групп, независимо от принадлежности к группе, а

наличие значимого взаимодействия препарата и времени указывает на то, что степень влияния препарата зависела от времени наблюдения эффекта. Апостериорный тест Сидака для множественных сравнений между группами показал, что YdAGFLR статистически значимо повышал уровни мРНК SIRT1 во временных точках 2 ($p < 0,05$) и 6 часов ($p < 0,0001$) по сравнению с контролем.

Следует отметить, что пиковое повышение транскрипции SIRT1 под действием гексапептида YdAGFLR во временной точке 2 часа указывает на то, что вызываемый гексапептидом сдвиг эффекта повышения транскрипции SIRT1 в легких в условиях воспаления происходит в более ранние сроки, чем в контроле.

Таким образом, гексапептид YdAGFLR значимо повышает транскрипцию гена SIRT1 в легких мышей C57Bl/6Y с воспалением легких, индуцированным LPS, по сравнению с контролем.

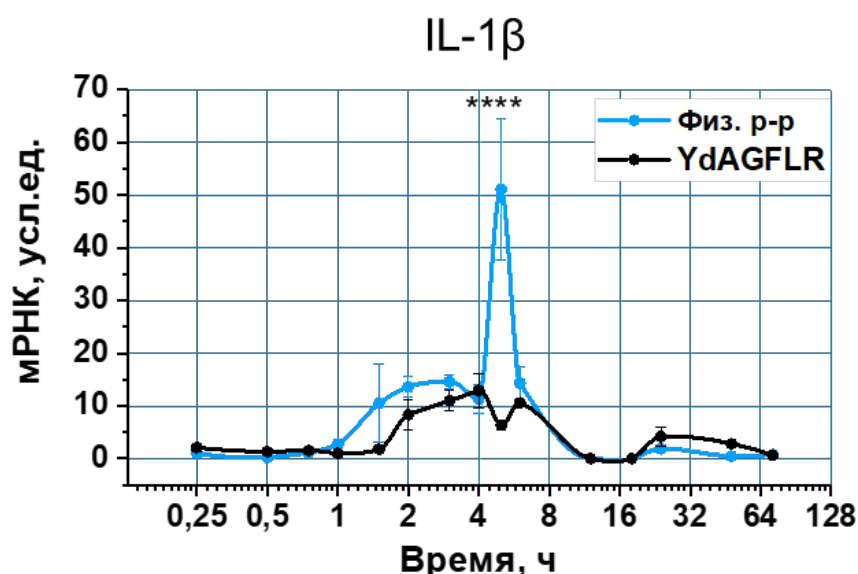


Рисунок 18 - Эффект однократного ингаляционного введения YdAGFLR на уровни мРНК IL-1 β в легких мышей C57BL/6 с острым воспалением легких, индуцированным LPS, в интервале наблюдений 0,25-72 ч, в сравнении с контролем (Физ. раствор). Символы — $M \pm m$ ($n=5$) экспериментальных значений в указанных временных точках; линии — интерполяция сплайнами Акима; **** — $p < 0,0001$ по сравнению с контролем (тест Сидака).

Одна усл. единица – средний уровень мРНК у интактных животных

Двухфакторный дисперсионный анализ (two-way ANOVA) выявил статистически значимый основной эффект YdAGFLR на уровни мРНК IL-1 β

($F_{1,120}=12,30$; $p=0,0006$; Рисунок 18), а также статистически значимый основной эффект фактора времени ($F_{14,120}=13,28$; $p<0,0001$) и значимое взаимодействие препарата и времени ($F_{14,120}=7,249$; $p<0,0001$). Наличие основного эффекта времени указывает на значительные изменения уровней (осцилляции) мРНК в разные моменты времени в каждой из групп, независимо от принадлежности к группе, а наличие значимого взаимодействия препарата и времени указывает на то, что степень влияния препарата зависела от времени наблюдения эффекта. Апостериорный тест Сидака для множественных сравнений между группами показал, что YdAGFLR статистически значимо снижал пиковую амплитуду мРНК IL-1 β во временной точке 5 ч ($p<0,0001$) по сравнению с контролем.

Таким образом, гексапептид YdAGFLR значимо снижает транскрипцию гена IL-1 β в легких мышей C57Bl/6Y с воспалением легких, индуцированным LPS, по сравнению с контролем.

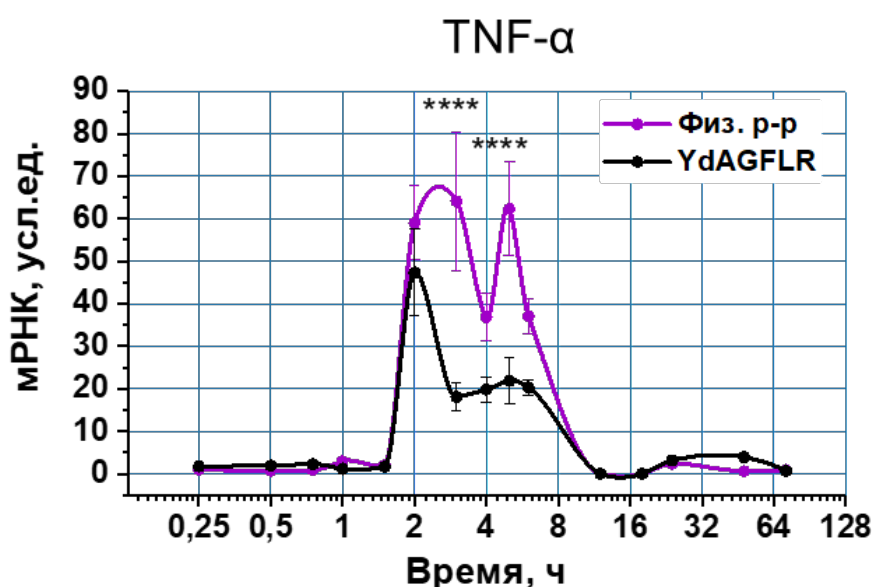


Рисунок 19 - Эффект однократного ингаляционного введения YdAGFLR на уровни мРНК TNF- α в легких мышей C57Bl/6 с острым воспалением легких, индуцированным LPS, в интервале наблюдений 0,25-72 ч, в сравнении с контролем (Физ. раствор). Символы — $M \pm m$ ($n=5$) экспериментальных значений в указанных временных точках; линии — интерполяция сплайнами Акима; **** — $p<0,0001$ по сравнению с контролем (тест Сидака).

Одна усл. единица – средний уровень мРНК у интактных животных

Двухфакторный дисперсионный анализ (two-way ANOVA) выявил статистически значимый основной эффект YdAGFLR на уровни мРНК TNF- α ($F_{1,120}=24,00$; $p<0,0001$; Рисунок 19), а также статистически значимый основной эффект фактора времени ($F_{14,120}=32,47$; $p<0,0001$) и значимое взаимодействие препарата и времени ($F_{14,120}=5,453$; $p<0,0001$). Наличие основного эффекта времени указывает на значительные изменения уровней (осцилляции) мРНК в разные моменты времени в каждой из групп, независимо от принадлежности к группе, а наличие значимого взаимодействия препарата и времени указывает на то, что степень влияния препарата зависела от времени наблюдения эффекта. Апостериорный тест Сидака для множественных сравнений между группами показал, что YdAGFLR статистически значимо снижал пиковые амплитуды мРНК TNF- α во временных точках 3 ($p<0,0001$) и 5 ч ($p<0,0001$) по сравнению с контролем. Таким образом, гексапептид YdAGFLR значимо снижает транскрипцию гена TNF- α в легких мышей C57Bl/6Y с воспалением легких, индуцированным LPS, по сравнению с контролем.

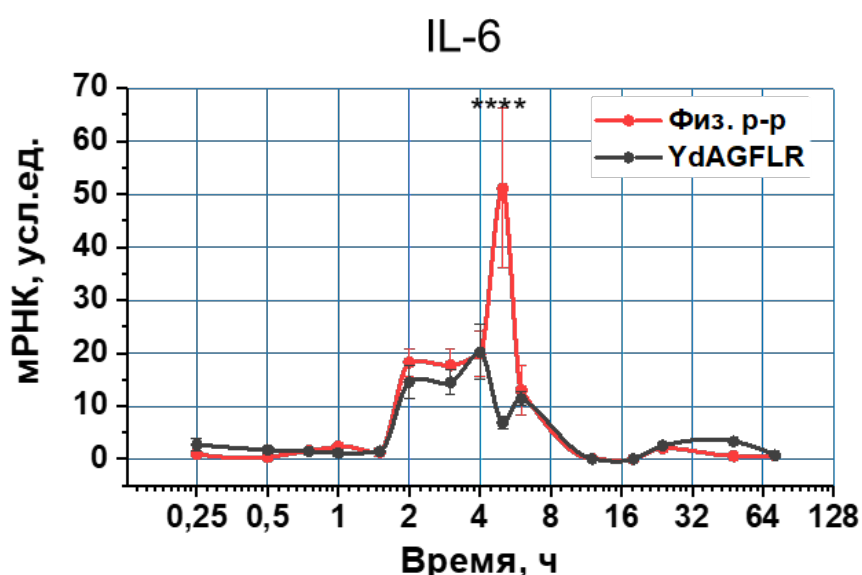


Рисунок 20 - Эффект однократного ингаляционного введения YdAGFLR на уровни мРНК IL-6 в легких мышей C57Bl/6 с острым воспалением легких, индуцированным LPS, в интервале наблюдений 0,25-72 ч, в сравнении с контролем (Физ. раствор). Символы — $M\pm m$ ($n=5$) экспериментальных значений в указанных временных точках; линии — интерполяция сплайнами Акима; ****— $p<0,0001$ по сравнению с контролем (тест Сидака).

Одна усл. единица – средний уровень мРНК у интактных животных

Двухфакторный дисперсионный анализ (two-way ANOVA) выявил статистически значимый основной эффект YdAGFLR на уровне мРНК IL-6 ($F_{1,120}=6,688$; $p=0,0109$; Рисунок 20), а также статистически значимый основной эффект фактора времени ($F_{14,120}=15,27$; $p<0,0001$) и значимое взаимодействие препарата и времени ($F_{14,120}=5,930$; $p<0,0001$). Наличие основного эффекта времени указывает на значительные изменения уровней (осцилляции) мРНК в разные моменты времени в каждой из групп, независимо от принадлежности к группе, а наличие значимого взаимодействия препарата и времени указывает на то, что степень влияния препарата зависела от времени наблюдения эффекта. Апостериорный тест Сидака для множественных сравнений между группами показал, что YdAGFLR статистически значимо снизил пиковую амплитуду мРНК IL-6 во временной точке 5 часов ($p<0,0001$) по сравнению с контролем.

Таким образом, гексапептид YdAGFLR значимо снижает транскрипцию гена IL-6 в легких мышей C57Bl/6Y с воспалением легких, индуцированным LPS, по сравнению с контролем.

Для того, чтобы сравнить общий эффект гексапептида YdAGFLR на транскрипцию генов SIRT1, IL-1 β , TNF- α и IL-6 в легких мышей C57Bl/6Y с острым воспалением легких во всем периоде наблюдений, были вычислены площади под кривыми в этот период. Сравнение площадей под кривыми осцилляций мРНК SIRT1, IL-1 β , TNF- α и IL-6 в период с 0,25 до 72 часа показывает, что YdAGFLR повышает интегральную транскрипцию SIRT1 в 2,5 раза ($p<0,0001$), снижая при этом транскрипцию провоспалительных цитокинов IL-1 β ($p<0,001$), TNF- α ($p<0,0001$) и IL-6 ($p<0,01$) в 1,9; 1,9 и 1,6 раза, соответственно, по сравнению с соответствующими контролями (Рисунок 21).

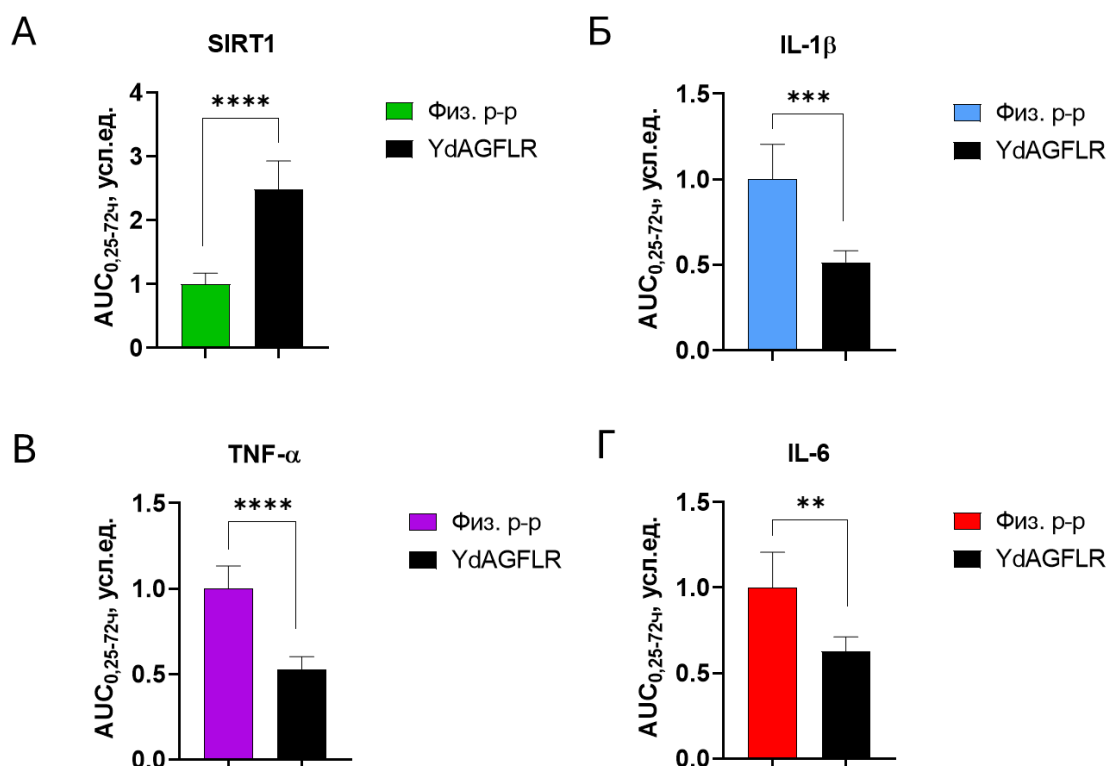


Рисунок 21 - Эффекты однократного ингаляционного введения YdAGFLR на площади под кривыми осцилляций мРНК SIRT1 (А), IL-1β (Б), TNF-α (В) и IL-6 (Г) в легких мышей линии C57BL/6 с острым воспалением легких, индуцированным LPS, за период 0,25-72 ч. Столбцы — $M \pm m$ (n=5); ** — $p < 0,01$, *** — $p < 0,001$, **** — $p < 0,0001$ по сравнению с контролем (непарный двусторонний *t*-тест Стьюдента)

В целом, результаты настоящего исследования показывают, что моделирование острого воспаления легких у мышей C57Bl/6Y с использованием системы α -GalCer/LPS вызывает повышение в легких транскрипции генов провоспалительных цитокинов IL-1β, IL-6, TNF-α и SIRT1 в виде периодических подъемов падений концентраций мРНК во времени колебаний (осцилляций), с затуханием колебаний уровней мРНК IL-1β, IL-6 и TNF-α к 24 часам наблюдений, при том, что уровень мРНК SIRT1 остается высоким, что подтверждает гипотезу о роли SIRT1 как фактора разрешения воспаления [173]. Гексапептид YdAGFLR влиял на транскрипцию указанных генов, статистически значимо снижая амплитуду осцилляций провоспалительных цитокинов и повышая транскрипцию SIRT1.

3.4. 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 того, чтобы оценить влияние YdAGFLR на динамику изменений уровней провоспалительных цитокинов IL-1 β , TNF- α и IL-6 в легких, гексапептид YdAGFLR или физ. раствор (контроль) вводили однократно ингаляционно с использованием аэрозольной камеры из п. 2.3.2 в легкие мышей C57Bl/6Y с воспалением легких, индуцированным LPS, после чего отбирались пробы бронхоальвеолярного лаважа и проводились измерения уровней цитокинов в течение 72 часов, как детально описано в п. 2.3.6.

Двухфакторный дисперсионный анализ (two-way ANOVA) выявил статистически значимый основной эффект времени на концентрации цитокина IL-1 β ($F_{9,40}=2,353$; $p=0,0308$; Рисунок 22А) в бронхолегочном лаваже в первые 6 часов наблюдений после введения препаратов, что связано с выраженными колебаниями уровней IL-1 β в этот период в каждой из двух групп независимо от принадлежности к группе.

Однако, этот же анализ не выявил статистически значимого основного эффекта гексапептида YdAGFLR на концентрации цитокина IL-1 β ($F_{1,40}=0,0308$; $p=0,8615$) в бронхолегочном лаваже в этом же периоде наблюдений, что указывает на отсутствие статистически значимого отличия эффекта YdAGFLR от эффекта физ. раствора, который получали контрольные животные. Таким образом, в ранней фазе воспаления 0,25 – 6 часов гексапептид YdAGFLR не влиял статистически значимо на концентрацию IL-1 β в бронхолегочном лаваже.

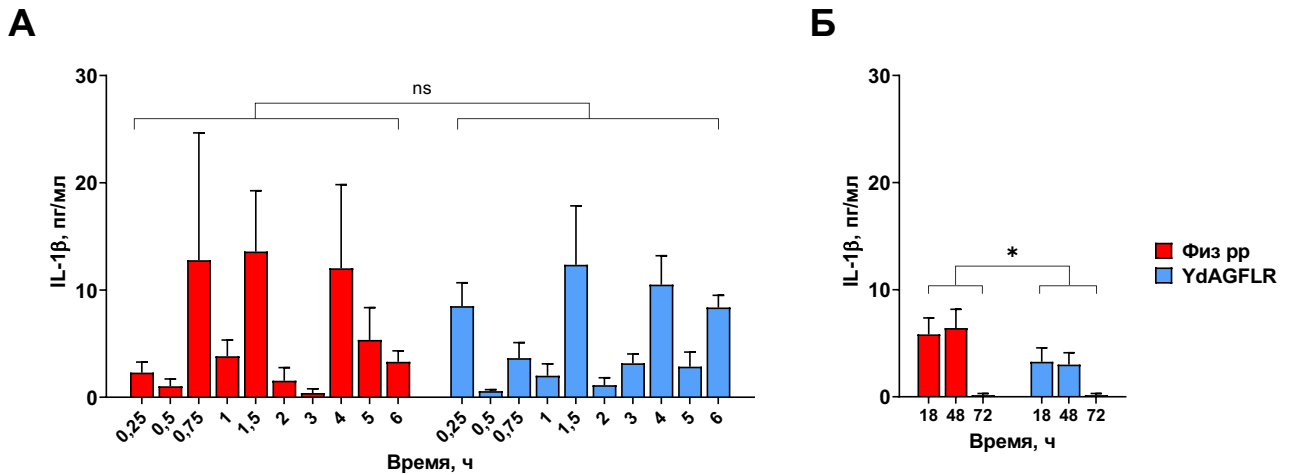


Рисунок 22 - Эффекты однократного ингаляционного введения YdAGFLR на уровни IL-1 β в БАЛ из легких мышей C57BL/6 с острым воспалением легких, индуцированным LPS, в интервале 0,25-6 ч (А) и 18-72 ч (Б) после введения препаратов в сравнении с контролем (физ. раствор). Столбцы — $M \pm m$ ($n=3$) экспериментальных значений в указанных временных точках в интервале 0,25-6 ч и ($n=6$) – в интервале 18-72 ч; ns — $p > 0,05$, * — $p < 0,05$ по сравнению с контролем (Физ. pp)

Однако, во второй поздней фазе наблюдений в период 18-72 ч после введения препаратов, двухфакторный дисперсионный анализ (two-way ANOVA) выявил статистически значимый основной эффект гексапептида YdAGFLR ($F_{1,30}=4,246$; $p=0,0481$; Рисунок 22Б) и основной эффект времени ($F_{2,30}=9,521$; $p=0,0006$) на уровни IL-1 β в бронхолегочном лаваже. Таким образом, YdAGFLR статистически значимо снижал уровни IL-1 β в бронхолегочном лаваже по сравнению с контролем (физ. раствор) в поздней фазе воспаления 18 – 72 часа, при выраженных колебаниях уровней IL-1 β в этот период в каждой из двух групп, независимо от принадлежности к группе.

Двухфакторный дисперсионный анализ (two-way ANOVA) выявил статистически значимый основной эффект времени на концентрации цитокина TNF- α ($F_{9,40}=4,134$; $p=0,0008$; Рисунок 23А) в бронхолегочном лаваже в первые 6 часов наблюдений после введения препаратов, что связано с выраженными колебаниями уровней TNF- α в этот период в каждой из двух групп.

Однако, этот же анализ не выявил статистически значимого основного эффекта гексапептида YdAGFLR на концентрации цитокина TNF- α ($F_{1,40}=2,686$;

$p=0,1091$) в бронхолегочном лаваже в этом же периоде наблюдений, что указывает на отсутствие статистически значимого отличия эффекта YdAGFLR от эффекта физ. раствора, который получали контрольные животные. Таким образом, в ранней фазе воспаления 0,25 – 6 часов гексапептид YdAGFLR не влиял статистически значимо на концентрацию TNF- α в бронхолегочном лаваже.

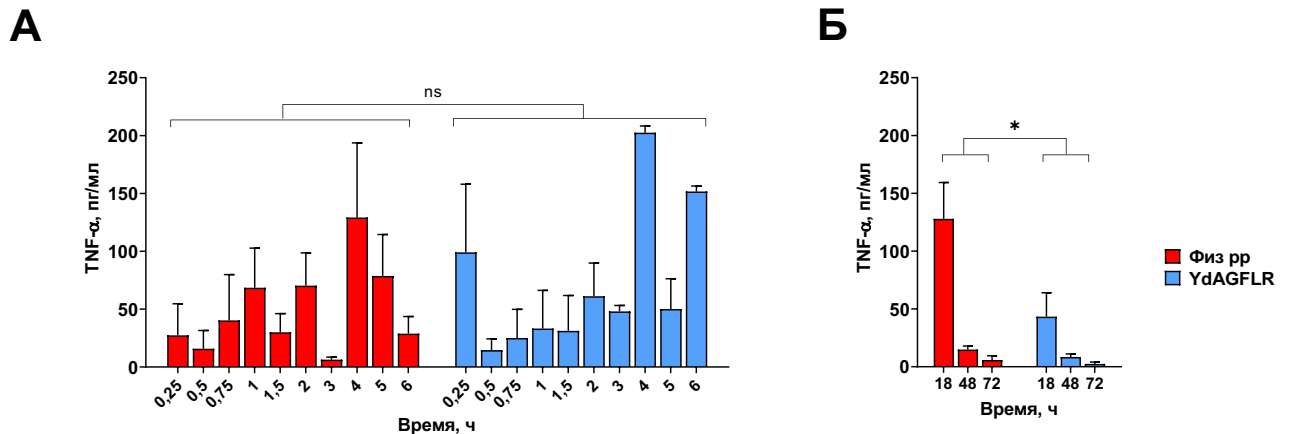


Рисунок 23 - Эффекты однократного ингаляционного введения YdAGFLR на уровни TNF- α в БАЛ из легких мышей C57BL/6 с острым воспалением легких, индуцированным LPS, в интервале 0,25-6 ч (А) и 18-72 ч (Б) после введения препаратов в сравнении с контролем (физ. раствор). Столбцы — $M \pm m$ ($n=3$) экспериментальных значений в указанных временных точках в интервале 0,25-6 ч и ($n=6$) – в интервале 18-72 ч; ns— $p>0,05$, *— $p<0,05$ по сравнению с контролем (Физ. pp)

Однако, в поздней фазе наблюдений в период 18-72 ч после введения препаратов, двухфакторный дисперсионный анализ (two-way ANOVA) выявил статистически значимый основной эффект гексапептида YdAGFLR ($F_{1,29}=7,441$; $p=0,0107$; Рисунок 23Б) и основной эффект времени ($F_{2,29}=19,67$; $p<0,0001$) на уровни TNF- α в бронхолегочном лаваже. Таким образом, YdAGFLR статистически значимо снижал уровни TNF- α в бронхолегочном лаваже по сравнению с контролем (физ. раствор) в поздней фазе воспаления 18 – 72 часа, при выраженных колебаниях уровней TNF- α в этот период в каждой из двух групп, независимо от принадлежности к группе.

Двухфакторный дисперсионный анализ (two-way ANOVA) выявил статистически значимый основной эффект времени на концентрации

провоспалительного цитокина IL-6 ($F_{9,40}=3,220$; $p=0,0050$; Рисунок 24А) в бронхолегочном лаваже в первые 6 часов наблюдений после введения препаратов, что связано с выраженными колебаниями уровней IL-6 в этот период в каждой из двух групп независимо от принадлежности к группе.

Однако, этот же анализ не выявил статистически значимого основного эффекта гексапептида YdAGFLR на концентрации цитокина IL-6 ($F_{1,40}=0,3670$; $p=0,5481$) в бронхолегочном лаваже в этом же периоде наблюдений, что указывает на отсутствие статистически значимого отличия эффекта YdAGFLR от эффекта физ. раствора, который получали контрольные животные. Таким образом, в ранней фазе воспаления 0,25 – 6 часов гексапептид YdAGFLR не влиял статистически значимо на концентрацию IL-6 в бронхолегочном лаваже.

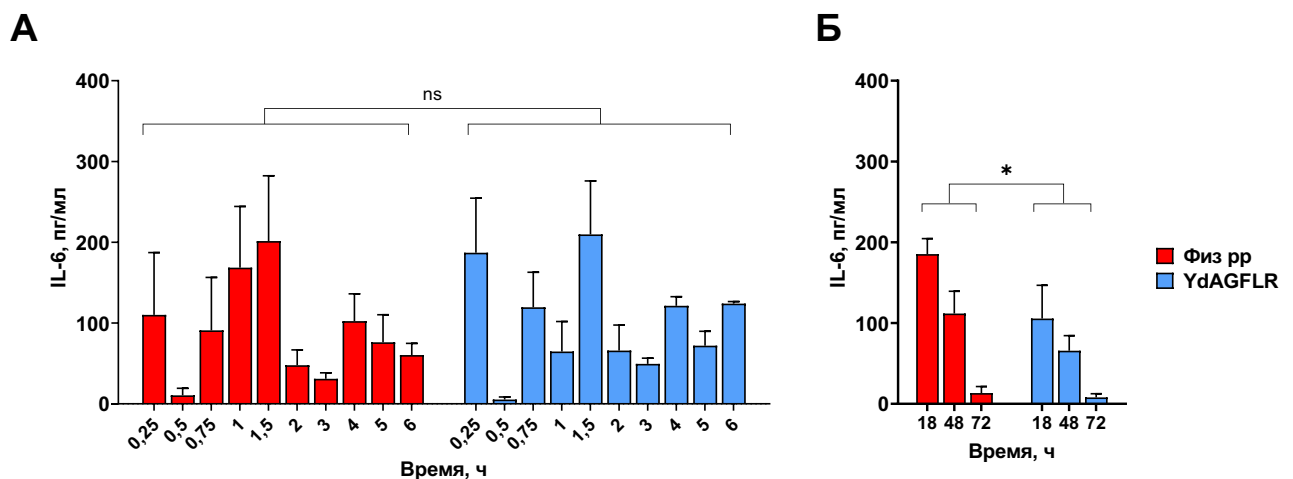


Рисунок 24 - Эффекты однократного ингаляционного введения YdAGFLR на уровни IL-6 в БАЛ из легких мышей C57BL/6 с острым воспалением легких, индуцированным LPS, в интервале 0,25-6 ч (А) и 18-72 ч (Б) после введения препаратов в сравнении с контролем (физ. раствор). Столбцы — $M \pm m$ ($n=3$) экспериментальных значений в указанных временных точках в интервале 0,25-6 ч и ($n=6$) – в интервале 18-72 ч; ns — $p > 0,05$, * — $p < 0,05$ по сравнению с контролем (Физ. pp)

В поздней фазе наблюдений в период 18-72 ч после введения препаратов, двухфакторный дисперсионный анализ (two-way ANOVA) выявил статистически значимый основной эффект гексапептида YdAGFLR ($F_{1,30}=5,293$; $p=0,0285$; Рисунок 24Б) и основной эффект времени ($F_{2,30}=16,90$; $p < 0,0001$) на уровни IL-6 в

бронхолегочном лаваже. Таким образом, YdAGFLR статистически значимо снижал уровни IL-6 в бронхолегочном лаваже по сравнению с контролем (физ. раствор) в поздней фазе воспаления 18 – 72 часа, при выраженных колебаниях уровней IL-6 в этот период в каждой из двух групп, независимо от принадлежности к группе.

В целом, гексапептид YdAGFLR статистически значимо снижал уровни провоспалительных цитокинов IL-1 β , TNF- α и IL-6 в легких мышей C57Bl/6Y с острым воспалением легких, но только в поздней фазе воспаления в период с 18 до 72 часов после индукции воспаления, не влияя при этом на уровни этих же цитокинов в первые 6 часов ранней фазы развития воспаления. Таким образом, основное анти-цитокиновое действие гексапептида YdAGFLR реализуется на стадии разрешения воспаления.

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Ранее, в ряде экспериментальных исследований было показано, что гексапептид Tyr-D-Ala-Gly-Phe-Leu-Arg, синтетическое производное динорфина (1-6), может проявлять противовоспалительный эффект [17, 18, 83, 84], механизм которого включает повышение транскрипции гена сиртуина 1 [17], гистоновой деацетилазы III класса, проявляющей выраженную противовоспалительную активность, деацетилируя такие субстраты как транскрипционный фактор NF-κB [88] и медиатор летальности при сепсисе HMGB1 [109]. Так, в доклинических исследованиях эффективности гексапептида Tyr-D-Ala-Gly-Phe-Leu-Arg при ингаляционном введении было показано, что гексапептид значительно повышает выживаемость мышей C57Bl/6Y с острым воспалительным повреждением легких, вызванным введением α-GalCer/LPS [83, 84], снижает в легких транскрипцию генов провоспалительных цитокинов IL-1β и IL-6, а также интерферонов IFN-α и IFN-β [18]. Ингаляционное введение гексапептида значительно ингибирует в легких мышей C57Bl/6Y стимулированную липополисахаридом секрецию HMGB1 по механизму, включающему снижение ацетилирования остатков лизина в сайтах ядерной локализации HMGB1 и связанному с этим снижению секреции HMGB1 из ядра в цитоплазму и далее во внеклеточное пространство [17], что согласуется с известным фактом, что HMGB1 является субстратом SIRT1 [86]. С учетом того, что субстратом SIRT1 также является транскрипционный фактор NF-κB [88], который контролирует транскрипцию генов провоспалительных цитокинов IL-1β, IL-6 и TNF-α, а также хемокинов и молекул адгезии [124], все противовоспалительные эффекты этого синтетического производного динорфина, связанные со снижением продукции цитокинов [18, 57, 60] и снижением секреции HMGB1 [17], могут быть полностью объяснены его способностью повышать транскрипцию гена SIRT1 в условиях воспаления. Однако, неизвестно, насколько общим является этот выявленный механизм с участием SIRT1 для других пептидов семейства динорфина. Неизвестно также, могут ли влиять производные динорфинов на транскрипцию других шести членов семейства сиртуинов млекопитающих, среди

которых на дату исследования известно, что еще SIRT2 и SIRT6 также обладают противовоспалительной активностью [115, 116, 121]. Неизвестно также, как динорфины и их синтетические производные влияют на динамику изменений транскрипции и экспрессии провоспалительных цитокинов в условиях воспаления в широком временном интервале, включающем как раннюю стадию инициации, так и позднюю стадию разрешения воспаления. Подобные работы неизвестны из научной литературы. Настоящее исследование ставило своей целью поиск ответов на указанные выше вопросы.

На первом этапе настоящей работы был валидирован способ ингаляционного введения пептидов мышам в легкие с использованием разработанной в ФГБУН НЦБМТ ФМБА России аэрозольной камеры. Необходимость валидации аэрозольного введения была обусловлена тем, что мыши имеют физиологическое расхождение в системе дыхания с человеком, а именно облигатное носовое дыхание, и в то время, как человек может дышать и ртом, и носом, мышь дышит только носом, и при работе с мышами отсутствует возможность объективно проверить факт вдыхания животными исследуемого препарата. Кроме того, эффективность доставки препарата в легкие при ингаляционном введении прямо зависит от конструкции используемой аэрозольной камеры. Разработанная в ходе настоящего исследования аэрозольная камера обеспечивает равный доступ группе мышей до 8 особей включительно к аэрозолю и достижение требуемого терапевтического эффекта, а именно повышения транскрипции SIRT1 в ткани легкого в условиях острого воспаления. Этот эффект релевантен повышению уровней SIRT1 в условиях воспаления у человека, как было показано в недавнем мета-анализе, обобщившего клинические данные от 2208 участников и подтвердившего общее повышение уровней SIRT1 в условиях воспаления [188].

Ингаляционное введение исследуемого гексапептида с использованием аэрозольной камеры обеспечивает его быструю доставку в легкие, сопровождающуюся повышением максимальной концентрации в легких до 358,5 нг/г в течение 10 мин при среднем времени удерживания 27,7 мин. Время

полувыведения гексапептида из легких составляет 25,8 мин. Следует отметить, что эти показатели существенно превосходят наблюдаемые в сыворотке крови, где максимальная концентрация гексапептида составляла только 15% от наблюдаемой в легких и площадь под кинетической кривой гексапептида в крови была в два раза ниже, чем в легких. Таким образом, использование аэрозольной камеры из п. 2.3.2 настоящей работы позволяет доставлять исследуемый гексапептид YdAGFLR в легкие мышей и обеспечить заявленный терапевтический эффект повышения транскрипции SIRT1 в легких, что позволяет проводить исследования механизма действия препаратов при ингаляционном введении с использованием аэрозольной камеры из п.2.3.2.

Сравнение полученных в настоящем исследовании фармакокинетических параметров кривых распределения гексапептида в легких и сыворотке крови позволяет сделать вывод о том, что основным сайтом действия гексапептида при ингаляционном введении являются ткани легких мышей, что является обоснованием выбора легочной ткани как целевой ткани для исследования механизма противовоспалительного действия синтетических производных динорфина на мышинной модели острого воспаления легких в настоящей работе.

На втором этапе, было выполнено исследование, имеющее своей целью выяснение того, является ли известный эффект повышения транскрипции SIRT1 в легких мышей с острым воспалением легких при ингаляционном введении гексапептида YdAGFLR [17] изолированным и относящимся только к SIRT1, или этот гексапептид также может влиять на транскрипцию других гистоновых деацетилаз из класса сиртуинов. Для начала был изучен транскриптом сиртуинов в легких интактных мышей, и было показано, что SIRT1 и SIRT6 являются основными сиртуинами, представленными в общем транскриптом (>99%). Было показано, что индукция воспаления легких при интратрахеальном введении α -GalCer/LPS ведет к повышению в легких мышей уровней мРНК всех семи известных сиртуинов относительно уровней, наблюдаемых у интактных животных. Так, воспаление повысило содержание мРНК основных ядерных сиртуинов SIRT1 и SIRT6 в легких в 3,7 и 1,7 раза, но также вызывало многократное повышение

транскрипции минорных сиртуинов, таких как цитозольный SIRT2 (в 36 раз) и митохондриальные SIRT3 (в 40 раз) и SIRT4 (в 56 раз) по сравнению с интактным контролем. Уровни минорных сиртуинов SIRT5 и SIRT7 также выросли, но меньше, в 3 и 1,7 раза, соответственно, по сравнению с интактным контролем. Таким образом, воспаление само по себе повышает уровни транскрипции генов сиртуинов, в том числе сиртуинов 1, 2 и 6, которые обладают выраженным противовоспалительным эффектом.

Ингаляционное введение YdAGFLR мышам с острым воспалением легких дополнительно повысило транскрипцию генов ядерных сиртуинов SIRT1, SIRT6 и SIRT7, цитозольного сиртуина SIRT2, а также митохондриальных сиртуинов SIRT3 и SIRT5 по сравнению с контрольными животными с острым воспалением легких. Суммарное действие воспаления и введения гексапептида YdAGFLR повышает в легких уровни транскрипции SIRT1 в 21 раз, SIRT2 – в 576 раз, а SIRT6 – в 11 раз относительно уровней транскрипции этих сиртуинов у интактных животных. Так как противовоспалительное действие известно для сиртуинов SIRT1 [115], SIRT2 [116] и SIRT6 [121], факт повышения транскрипции этих сиртуинов в легких мышей с острым воспалением легких при введении гексапептида YdAGFLR позволяет оценить его противовоспалительное действие по-новому, как более комплексное и включающее повышение транскрипции противовоспалительных сиртуинов SIRT1, SIRT2 и SIRT6, а не только известное повышение транскрипции SIRT1 [17].

В целом, в настоящей работе впервые показано, что противовоспалительный эффект гексапептида YdAGFLR, синтетического производного динорфина с преимущественно δ -опиоидной активностью, не ограничивается повышением транскрипции только SIRT1, а является более сложным и включает еще и эффект повышения транскрипции SIRT6 и, в меньшей степени, SIRT2.

Для того, чтобы выяснить, насколько общим является выявленный для гексапептида YdAGFLR эффект повышения транскрипции сиртуинов для других производных динорфина, в настоящем исследовании был изучен эффект гептапептида YdAGFLR-NH₂ на транскрипцию сиртуинов в этой же модели

острого воспаления легких на мышах C57Bl/6Y. Указанный гептапептид был выбран и синтезирован ФГБУ НЦБМТ ФМБА России [72], с учетом того, что согласно литературным данным наивысшей противовоспалительной активностью среди эндогенных динорфинов обладает его прототип DYN 1-7 [13], обладающий к-опиоидной активностью.

Было показано, что гептапептид YdAGFLRR-NH₂, синтетический стабилизированный аналог эндогенного DYN 1-7, при ингаляционном введении мышам C57Bl/6Y с индуцированным острым воспалением легких вызывает статистически значимое повышение в легких уровней мРНК SIRT1 в 9,1 раза, SIRT2 в 6,1 раза и SIRT6 в 3,6 раза по сравнению с контрольными животными с острым воспалением легких, получавших ингаляционно физ. раствор. Таким образом, в настоящей работе впервые показано, что эффект повышения транскрипции сиртуинов в условиях воспаления может быть общим свойством производных динорфина, обладающих опиоидной активностью, что открывает перспективу поиска новых противовоспалительных средств в классе синтетических производных динорфина.

На следующем этапе настоящего исследования была изучена динамика изменений транскриптома, включающего гены SIRT1 и гены провоспалительных цитокинов IL-1 β , TNF- α и IL-6, в легких мышей C57Bl/6Y с острым воспалением легких в интервале 0,25 – 72 часа после индукции воспаления. Основанием для такого выбора генов являются данные ряда исследований, показавшие, что SIRT1, наряду с провоспалительными цитокинами является целевым геном, экспрессия которого также инициируется транскрипционным фактором NF- κ B [150, 151, 172-176]. Однако, в отличие от экспрессируемых провоспалительных цитокинов, усиливающих воспалительный ответ, SIRT1, наоборот, подавляет воспаление через деацетилирование лизина K³¹⁰ в составе белка p65 гетеродимера NF- κ B, снижающего полную транскрипционную активность NF- κ B [88]. Таким образом, согласно гипотезе Kauppinen и др. [173], транскрипция SIRT1 при активации воспаления транскрипционным фактором NF- κ B играет роль отрицательной

обратной связи, снижающей транскрипционную активность NF-κB и приводящую к разрешению воспаления.

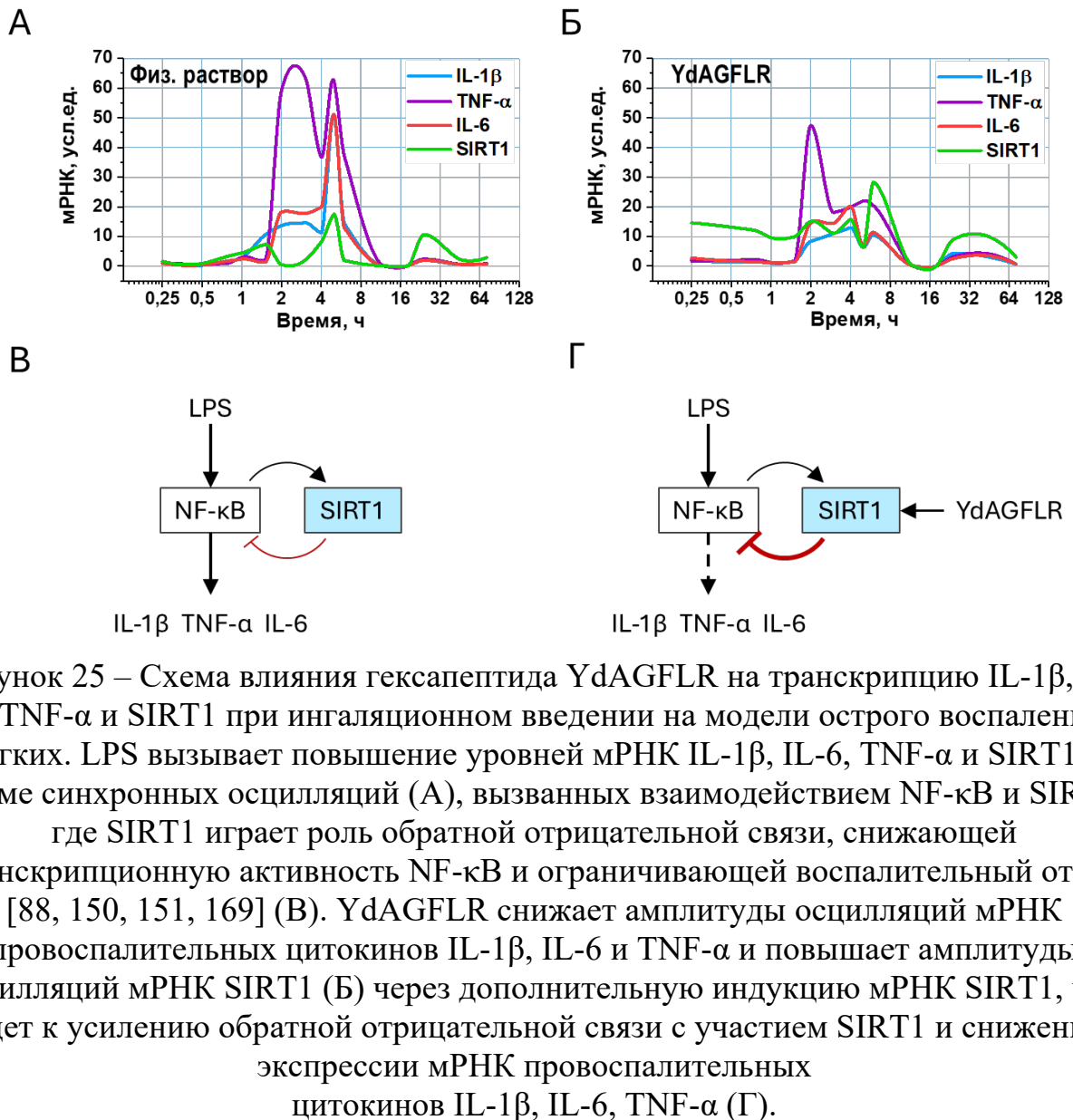
В настоящем исследовании впервые показано, что индукция острого воспаления легкими введением LPS вызывает периодические колебания (осцилляции) уровней мРНК IL-1β, IL-6, TNF-α и SIRT1 в легких, характеризующиеся периодическими подъемами и падениями концентраций мРНК во времени. Известно, что наличие регуляторной обратной отрицательной связи в биологических системах неизбежно приводит к появлению периодических колебаний (осцилляций), которые затухают при исчезновении индуктора таких колебаний [189], поэтому наличие таких осцилляций является аргументом в пользу гипотезы о роли SIRT1 как факторе, обеспечивающем отрицательную обратную связь в системе регуляции воспалительного ответа, вызываемого транскрипционным фактором NF-κB [173].

Сравнение временных профилей экспрессии мРНК провоспалительных цитокинов и SIRT1 показывает, что амплитуды осцилляций мРНК цитокинов максимальны в ранней фазе воспаления и достигают максимума через 5 часов после индукции воспаления легких, тогда как высокие уровни мРНК SIRT1 наблюдаются не только в раннем периоде воспаления, но и в позднем (24 часа), когда осцилляции мРНК провоспалительных цитокинов уже затухают. Этот результат в целом согласуется с представлениями о роли SIRT1 как о факторе, действующем в поздней фазе разрешения воспаления [88, 150, 151, 169]. Кроме того, полученные результаты полностью согласуются с гипотезой о роли SIRT1 как факторе обратной отрицательной связи, вовлеченном в разрешение воспаления и дают дополнительное экспериментальное подтверждение этой гипотезе, впервые предоставляя экспериментальные данные о наличии синхронных осцилляций мРНК целевых генов, вовлеченных в воспалительный ответ, и гена SIRT1.

В настоящем исследовании впервые показано, что однократное ингаляционное введение гексапептида YdAGFLR существенно изменяет характер осцилляций мРНК цитокинов и SIRT1 в легких мышей C57Bl/6Y с острым воспалением легких в интервале 0,25 – 72 часа по сравнению с контролем.

YdAGFLR статистически значимо повышал экспрессию мРНК SIRT1, при этом статистически значимо снижая амплитуды осцилляций мРНК провоспалительных цитокинов IL-1 β , TNF- α и IL-6, что в целом указывает на вклад YdAGFLR в усиление отрицательной обратной связи, регулирующей силу воспалительного ответа.

Сравнение кривых изменений концентраций мРНК SIRT1 и провоспалительных цитокинов IL-1 β , TNF- α и IL-6 в легких под действием гексапептида YdAGFLR раскрывает характерные особенности его противовоспалительного действия (Рисунок 25). Гексапептид не влиял на периодичность осцилляций, но статистически значимо снижал амплитуды колебаний мРНК провоспалительных цитокинов и повышал амплитуды осцилляций мРНК SIRT1 (Рисунок 25А и 25Б). Сравнение площадей под кривыми осцилляций мРНК в период с 0,25 до 72 часа показывает, что YdAGFLR повышает уровни мРНК SIRT1, снижая при этом транскрипцию провоспалительных цитокинов IL-1 β , IL-6 и TNF- α . Исходя из полученных данных можно предположить, что гексапептид YdAGFLR играет роль дополнительного индуктора мРНК SIRT1 в условиях воспаления, что ведет к общему повышению уровней мРНК SIRT1 и усилению отрицательной обратной связи, ограничивающей экспрессию провоспалительных цитокинов (Рисунок 25В и 25Г). С учетом полученных результатов, предположительная схема действия YdAGFLR как противовоспалительного препарата включает воздействие на физиологический механизм отрицательной обратной связи, регулирующей экспрессию провоспалительных цитокинов.



На последнем этапе настоящего исследования было изучено влияние ингаляционного введения гексапептида YdAGFLR на динамику изменений концентраций провоспалительных цитокинов IL-1β, IL-6 и TNF-α в бронхолегочном лаваже из легких мышей C57Bl/6Y с острым воспалением легких во временном интервале 0,25 – 72 часа. С учетом данных о временных профилях транскрипции генов IL-1β, IL-6, TNF-α и SIRT1, полученных в настоящем исследовании, для исследования динамики цитокинов в бронхолегочном лаваже были выбраны два периода, ранняя фаза воспаления (первые 6 часов после

индукции воспаления) и поздняя фаза разрешения воспаления (период 18 – 72 часа после индукции воспаления).

Было показано, что гексапептид YdAGFLR при ингаляционном введении не влияет на концентрации цитокинов IL-1 β , IL-6 и TNF- α в бронхолегочном лаваже из легких мышей C57Bl/6Y с острым воспалением легких в фазе развития воспаления (первые 6 часов) по сравнению с контролем. При этом, в этом периоде наблюдались значимые колебания концентраций цитокинов IL-1 β , IL-6 и TNF- α , отражающие, по-видимому, колебания уровней мРНК соответствующих цитокинов. Этот результат указывает на то, что гексапептид YdAGFLR не вызывает иммуносупрессию в терминах подавления продукции цитокинов, медиаторов воспаления, в ранней фазе развития воспалительного процесса.

Однако, в поздней фазе воспаления (интервал 18 – 72 часа) гексапептид YdAGFLR статистически значимо снижает концентрацию цитокинов IL-1 β , IL-6 и TNF- α в бронхолегочном лаваже из легких мышей C57Bl/6Y с острым воспалением легких. Этот факт указывает на значимую роль гексапептида YdAGFLR в фазе разрешения воспаления.

Снижение концентраций провоспалительных цитокинов в фазе разрешения воспаления под действием гексапептида YdAGFLR, полученное в настоящем исследовании на модели острого воспаления легких, по-видимому, может соответствовать более раннему наступлению клинического улучшения у пациентов с воспалительным заболеванием легких, как это было показано ранее в клинических исследованиях [190]. Гексапептид YdAGFLR был эффективен в качестве действующего вещества в составе ингаляционного лекарственного средства Лейтрагин при лечении COVID-19 [190], инфекционной пневмонии, вызываемой вирусом SARS-CoV-2 и, как известно, характеризующейся острым воспалительным процессом в легких с высоким риском развития «цитокинового шторма» и ОРДС [191-193]. В многоцентровом двойном слепом плацебо-контролируемом рандомизированном клиническом исследовании III фазы, ингаляции Лейтрагина статистически значимо снижали время до наступления клинического улучшения по порядковой категориальной шкале ВОЗ оценки

клинического состояния пациента, при соотношении рисков (Hazard Ratio) 1,529 для времени до клинического улучшения [190].

В целом, полученные результаты позволяют сделать обоснованное предположение о характере противовоспалительного действия синтетических производных динорфина на примере гексапептида YdAGFLR. На рисунке 26 представлена общая схема воспалительного процесса в соответствии с современными представлениями о развитии воспалительного процесса и результатами настоящего исследования на модели острого воспаления легких.

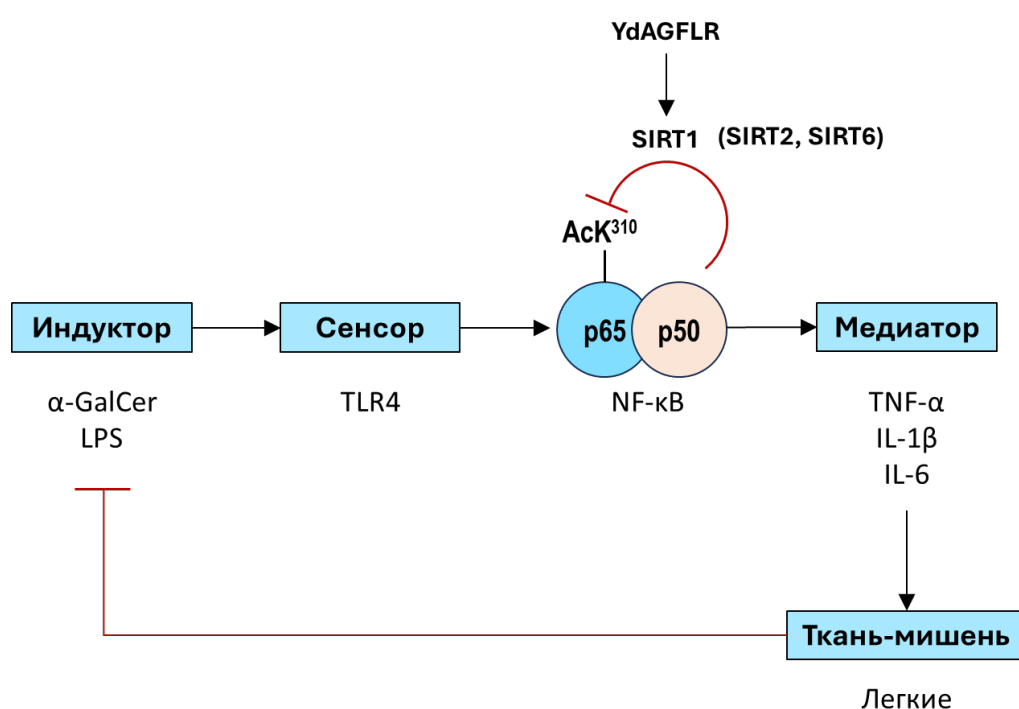


Рисунок 26 – Предположительная схема противовоспалительного действия гексапептида YdAGFLR на модели острого воспаления легких

Согласно общим представлениям, воспаление начинается с появления индуктора [194, 195], в настоящем исследовании индуктором является LPS введенный после предварительной сенсibilизации α-GalCer. Сенсор, в настоящем исследовании это рецептор распознавания TLR4, распознает LPS [196] и запускает канонический путь активации транскрипционного фактора NF-κB [138], который, в свою очередь активирует транскрипцию медиаторов воспаления, в данном случае транскрипцию цитокинов IL-1β, IL-6 и TNF-α [124]. Далее, образующиеся

цитокины связываются с соответствующими рецепторами на поверхности клеток ткани-мишени, в данном случае ткани легких, запускают программы воспалительного ответа, основной целью которых является элиминация индуктора. Для полной транскрипционной активности гетеродимера NF-κB, белок p65 в составе этого гетеродимера должен нести посттрансляционную модификацию, а именно быть ацетилированным по остатку лизина K³¹⁰ [88]. Помимо целевых генов провоспалительных цитокинов IL-1β, IL-6 и TNF-α, активация NF-κB запускает транскрипцию гена SIRT1, который выступает в роли отрицательной обратной связи, деацетилируя K³¹⁰ в составе p65, тем самым снижая транскрипционную активность NF-κB и снижая продукцию провоспалительных медиаторов [88]. До тех пор, пока индуктор находится в очаге воспаления, обратная отрицательная связь генерирует периодические колебания (осцилляции) уровней мРНК IL-1β, IL-6 и TNF-α, которые затухают по мере исчезновения индуктора. При этом уровни мРНК SIRT1 также снижаются, но со значительным запаздыванием относительно уровней мРНК провоспалительных цитокинов, что ведет к снижению экспрессии цитокинов и разрешению воспаления [173]. Таким образом, механизм обратной связи с участием SIRT1 является способом регуляции экспрессии медиаторов воспаления. В настоящем исследовании показано, что воспаление также повышает транскрипцию еще двух других противовоспалительных сиртуинов, SIRT2 и SIRT6, роль первого из которых состоит в деацетилировании K³¹⁰ в составе p65, но в цитоплазме, где SIRT2 преимущественно локализован [115]. SIRT6 деацетилюет гистон H3 (K⁹), что препятствует связыванию субъединицы p65 фактора NF-κB с промотером целевого гена и тем самым уменьшает транскрипцию провоспалительных цитокинов и воспалительный ответ [121].

Введение гексапептида YdAGFLR мышам с воспалением легких существенно влияет на протекание процесса воспаления из-за того, что гексапептид вызывает дополнительную транскрипцию SIRT1 в очаге воспаления. Дополнительная транскрипция SIRT1 повышает силу обратной отрицательной связи в регуляции транскрипционной активности NF-κB, что ведет к снижению экспрессии провоспалительных цитокинов в поздней фазе воспаления и

способствует разрешению воспаления. Кроме того, гексапептид YdAGFLR повышает транскрипцию сиртуинов SIRT2 и SIRT6, что вносит дополнительный вклад в разрешение воспаления, также действуя на стадию транскрипции генов провоспалительных цитокинов.

Такой же эффект повышения транскрипции SIRT1, SIRT2 и SIRT6 на той же модели острого воспаления легких был выявлен в настоящем исследовании для гептапептида YdAGFLRR-NH₂, что указывает на общность механизмов противовоспалительного действия производных динорфина. Таким образом, противовоспалительное действие производных динорфина YdAGFLR и YdAGFLRR-NH₂ связано с их способностью усиливать транскрипцию генов сиртуинов SIRT1, SIRT2 и SIRT6 в очаге воспаления, что способствует разрешению воспаления за счет снижения продукции провоспалительных цитокинов IL-1 β , IL-6 и TNF- α в позднем периоде воспаления.

Выявленный механизм действия производных динорфина позволяет сравнить его по действию с основными известными классами противовоспалительных лекарственных средств, используемых для лечения воспалительных заболеваний легких.

Глюкокортикостероиды (дексаметазон и метилпреднизолон) применяются для лечения тяжелой пневмонии [7, 8]. Глюкокортикостероиды, связываясь с глюкокортикоидным рецептором (ГР), вызывают транслокацию активного комплекса ГР-ГКС из цитоплазмы в ядро клетки и последующую активацию или репрессию целевых генов по трем основным направлениям, в том числе прямую активацию противовоспалительных генов, включая ингибитор κ B, прямую репрессию генов, а также непрямую репрессию генов, запускаемых NF- κ B, через динамическое взаимодействие ГР-ГКС с белком p65 гетеродимера NF- κ B, что ведет к подавлению транскрипции более, чем 350 генов, включая IL-1 β и TNF- α , в условиях воспаления [197, 198]. Помимо классических геномных механизмов подавления воспаления, комплексы ГР-ГКС могут также подавлять воспаление через негеномные механизмы, модулируя активность киназ, транскрипционных факторов и других молекул [198]. В целом, ГКС активно подавляют воспаление по

многим направлениям и могут вызывать иммуносупрессию. Отличие противовоспалительного действия производных динорфина от ГКС состоит в том, что динорфины преимущественно действуют на стадии разрешения воспаления, усиливая физиологическую обратную связь в действии NF-κB, но не подавляют продукцию медиаторов воспаления на стадии развития воспаления, что снижает риск развития иммуносупрессии при применении производных динорфина как противовоспалительных средств. Общность производных динорфина и ГКС в контексте их противовоспалительной активности состоит в том, что они неспецифичны и влияют сразу на множество медиаторов, а не на отдельные медиаторы воспаления.

Моноклональные антитела обладают высокой специфичностью к отдельным провоспалительным цитокинам или их рецепторам и по данным клинических исследований могут быть успешно использованы в лечении воспалительных заболеваний с выраженным специфическим повышением фактора, который может быть элиминирован антителом. Так, тоцилизумаб, антагонист рецептора IL-6, был эффективен в лечении пациентов с COVID-19, у которых наблюдались повышенные уровни IL-6 [199]. У этих пациентов тоцилизумаб проявлял тенденцию к уменьшению количества дней на искусственной вентиляции легких и сокращению продолжительности пребывания в стационаре по сравнению с пациентами, получавшими стандартное лечение.

Нестероидные противовоспалительные препараты (НПВП), широко используются для облегчения симптомов при внебольничной пневмонии, но многочисленные данные наблюдений подтверждают сильную связь между применением НПВП до госпитализации и задержкой направления в больницу, задержкой назначения антибиотикотерапии и возникновением плевропульмональных осложнений [200, 201]. В то же время, НПВП не повышают восприимчивость к COVID-19 и не влияют на тяжесть заболевания [202].

В целом, синтетические производные динорфина YdAGFLR и YdAGFLRR-NH₂ повышают транскрипцию противовоспалительных сиртуинов SIRT1, SIRT2 и SIRT6, гистоновых деацетилаз III класса, которые, как известно, являются

отрицательными регуляторами транскрипционной активности NF-κB, мастер-регулятора воспалительного ответа, контролирующего продукцию медиаторов воспаления, хемокинов и других провоспалительных молекул. Гексапептид YdAGFLR, действующее вещество в составе зарегистрированного ингаляционного лекарственного средства, снижает экспрессию провоспалительных цитокинов IL-1β, IL-6 и TNF-α в фазе разрешения воспаления, не вызывая подавления экспрессии этих цитокинов в ранней фазе воспаления, что может соответствовать снижению времени до клинического улучшения при лечении воспалительных заболеваний легких без индукции иммуносупрессии.

Таким образом, синтетические производные динорфина представляют собой новый класс противовоспалительных средств для лечения воспалительных заболеваний легких с механизмом действия, отличным от механизмов действия других коммерчески доступных противовоспалительных средств.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей работе валидирован способ ингаляционного введения пептидов на примере производного динорфина YdAGFLR мышам с использованием вновь разработанной оригинальной аэрозольной камеры, обеспечивающий доставку исследуемого вещества в легкие с параметрами достижения максимальной концентрации исследуемого вещества через 10,0 мин и временем полувыведения вещества из легких 25,8 мин [203]. Эффективность данного способа ингаляционного введения подтверждена на модели острого воспаления легких у мышей C57Bl/6Y, индуцированного последовательным введением стимулятора инвариантных естественных киллерных Т-клеток, и липополисахарида *E. coli*, агониста TLR4, по повышению транскрипции сиртуина SIRT1 в легких после ингаляционного введения производного динорфина YdAGFLR, что позволяет изучать механизм противовоспалительного действия синтетических производных динорфина на данной биомодели, при данном способе введения и с использованием разработанной оригинальной аэрозольной камеры [204].

В настоящей работе впервые показано, что синтетические производные динорфина на примере гексапептида YdAGFLR [205] и гептапептида YdAGFLRR-NH₂ [206] могут повышать транскрипцию не только гена SIRT1, но и других генов сиртуинов SIRT2, SIRT3, SIRT5, SIRT6 и SIRT7, кроме гена сиртуина SIRT4, из которых SIRT1, SIRT2 и SIRT6 обладают известным противовоспалительным действием. Поэтому противовоспалительное действие синтетических производных динорфина при ингаляционном введении обусловлено повышением транскрипции противовоспалительных SIRT1, SIRT2 и SIRT6 в очаге воспаления (легких).

Показано, что ранее показанный эффект повышения транскрипции SIRT1 гексапептидом YdAGFLR в условиях воспаления легких не является изолированным свойством только этого пептида, но, с учетом аналогичного действия гептапептида YdAGFLRR-NH₂, может являться общим свойством производных динорфина, что открывает перспективу для поиска новых противовоспалительных средств в классе синтетических производных динорфина.

Впервые показано, что индукция воспаления легких вызывает периодические колебания (осцилляции) уровней мРНК провоспалительных цитокинов и SIRT1 в легких, причем в ранней фазе развития воспаления преобладают мРНК цитокинов, тогда как в поздней фазе разрешения воспаления преобладает мРНК SIRT1. В целом, этот результат согласуется с известной гипотезой о том, что SIRT1 может являться фактором отрицательной обратной связи в транскрипции провоспалительных цитокинов и фактором разрешения воспаления.

Впервые показано, что в условиях моделирования острого воспаления легких производные динорфина на примере YdAGFLR могут повышать транскрипцию генов сиртуинов, одновременно снижая амплитуды осцилляций мРНК провоспалительных цитокинов, что, по-видимому, является основным механизмом противовоспалительного действия производных динорфина [207, 208].

Впервые показано, что производные динорфина на примере YdAGFLR могут снижать экспрессию провоспалительных цитокинов IL-1 β , IL-6 и TNF- α в фазе разрешения воспаления, не вызывая подавления экспрессии этих же цитокинов в ранней фазе воспаления, что указывает на отличительную особенность противовоспалительного действия производных динорфина, а именно способствовать разрешению воспаления, не вызывая иммуносупрессию в терминах подавления продукции медиаторов воспаления в ранней фазе воспаления [209].

Практическая значимость настоящей работы 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.

ВЫВОДЫ

1. Разработана аэрозольная камера на базе компрессорного ингалятора, позволяющая проводить ингаляции пептидными препаратами одновременно 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 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 и повышает 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 динорфина 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 (Приложение А).

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

ВОЗ – Всемирная организация здравоохранения
COVID 19 – Новая коронавирусная инфекция
ОРДС – Острый респираторный дистресс синдром
мРНК – Матричная рибонуклеиновая кислота
ГКС – Глюкокортикостероиды
DYN – Динорфин
PDYN – Продинорфин
MOR – μ опиоидный рецептор
DOR – δ опиоидный рецептор
KOR – κ опиоидный рецептор
GPCR – Рецепторы, сопряжённые с G белком
AP – Аминопептидаза
ACE – Ангиотензин превращающий фермент
NEP – Неприлизин эндопептидаза
THOP1 – Олигопептидаза тимет
ЦНС – Центральная нервная система
IC50 – Концентрация полумаксимального ингибирования
IL 1 β – Интерлейкин 1 β
TNF α – Фактор некроза опухоли α
NF κ B – Ядерный фактор каппа B
TLR4 – Толл подобный рецептор 4
HMGB1 – Белок группы высокой подвижности 1
IFN α , β – Интерфероны α и β
SIRT1 - 7 – Сиртуины 1–7
NAD⁺ – Никотин аденин динуклеотид
НАТ – Гистоновая ацетилтрансфераза
HDAC – Гистоновая деацетилаза
HIF 1 α – Гипоксией индуцируемый фактор 1 α

c Мус – Фактор транскрипции

E2F1 – Фактор транскрипции

FOXO1,3a,4 – Белки семейства forkhead box

p53 – Фактор транскрипции p53

PGC 1 α – Коактиватор 1 α активируемого пролифераторами пероксисом рецептора гамма

SREBP 1c – Белок 1c, связывающий регуляторный элемент стеролов

PPAR γ – Активируемый пролифераторами пероксисом рецептор гамма

Ku70 – Белок Ku70, участвующий в репарации ДНК

eNOS – Эндотелиальная синтаза оксида азота

PAX7 – Транскрипционный фактор парный бокс 7

АТФ – Аденозинтрифосфат

PAMP – Молекулярные паттерны, ассоциированные с патогеном

DAMP – Молекулярные паттерны, ассоциированные с повреждением

PRR – Рецепторы распознавания паттернов

TLR – Толл подобные рецепторы

RLR – RIG I подобные рецепторы

NLR – NOD подобные рецепторы

CTLLR – Лектиноподобные рецепторы типа C

DNAS – ДНК сенсоры

Икк – Икк киназа

NEMO – Необходимый модулятор NF κ B

TAK1 – Трансформирующим фактором роста β активируемая киназа 1

BCR – B клеточный рецептор

TCR – T клеточный рецептор

TNFR1 – Рецептор фактора некроза опухоли 1

IL 1R1 – Рецептор интерлейкина 1 типа 1

IL 6 – Интерлейкин 6

IL 8 – Интерлейкин 8

MCP 1 – Моноцитарный хемотаксический белок 1

ICAM 1 – Молекула межклеточной адгезии 1

VCAM 1 – Молекула адгезии сосудистых клеток 1

Vcl 2 – В клеточная лимфома 2

XIAP – X связанный ингибитор апоптоза

IAP1, IAP2 – Ингибиторы апоптоза 1 и 2

FLIP – FLICE подобный ингибиторный белок

MD 2 – Фактор миелоидной дифференциации - 2

CBP – CREB связывающий белок

PCAF – p300/CBP ассоциированный фактор

ANOVA – Дисперсионный анализ

ВЭЖХ МС – Высокоэффективная жидкостная хроматография с масс
спектрометрией

α GalCer – α Галактозилцерамид

ПЦР – Полимеразная цепная реакция

БАЛ – Бронхоальвеолярный лаваж

Cmax – Максимальная концентрация

Tmax – Время достижения максимальной концентрации

t1/2el – Период, за который выводится половина введенной и всосавшейся дозы

MRT – Среднее время удержания

AUC – Площадь под фармакокинетической кривой.

ГР – Глюкокортикоидный рецептор

НПВП – Нестероидные противовоспалительные средства

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. World Health Organization: official website. Pneumonia (WHO, 2023) [Electronic resource] – https://www.who.int/health-topics/pneumonia#tab=tab_1 (дата обращения 25.04.2024).
2. Проявления эпидемического процесса внебольничных пневмоний в период эпидемии COVID-19 на территории Российской Федерации / Б. А. Жигарловский, Н. Ф. Никитюк, В. Б. Поступайло [и др.] // Медицина экстремальных ситуаций. – 2021. – № 1. – С. 12–23.
3. Этиология тяжелой внебольничной пневмонии у взрослых в РФ: предварительные результаты многоцентрового исследования Sepia / С. А. Рачина, И. А. Захаренков, Н. Н. Дехнич [и др.] – Текст: непосредственный // Молекулярная диагностика 2017: сборник трудов IX Всероссийской научно-практической конференции с международным участием. – Тамбов: ООО фирма «Юлис». – 2017. – С. 256–257.
4. Игоревич, С. А. Внебольничная пневмония у взрослых: 2 / С. А. Игоревич // Клиницист. – 2006. – № 2. – С. 4–12.
5. Community-acquired pneumonia / L. F.Reyes, J.Rello, I.Martin-Loeches [et al.] // The Lancet. – 2025. – Vol. 406. – №. 10517. – P. 2371–2388.
6. Hydrocortisone in Severe Community-Acquired Pneumonia / P. F. Dequin, F. Meziani, J.-P. Quenot [et al.] // New England Journal of Medicine. – 2023. – Vol. 388. – №. 21. – P. 1931–1941.
7. 2024 Focused Update: Guidelines on Use of Corticosteroids in Sepsis, Acute Respiratory Distress Syndrome, and Community-Acquired Pneumonia / D. Chaudhuri, A. M. Nei, B. Rochwerg [et al.] // Critical Care Medicine. – 2024. – Vol. 52. – №. 5. – P. 219–233.
8. Efficacy and safety of glucocorticoids in the treatment of severe community-acquired pneumonia: A meta-analysis / S. Jiang, T. Liu, Y. Hu [et al.] // Medicine (Baltimore). – 2019. – Vol. 98. – №. 26. – P. 6239.

9. Diagnosis and Management of Community-acquired Pneumonia: An Official American Thoracic Society Clinical Practice Guideline / B. E. Jones, D. D. Herman, M. J. V. Pugh [et al.] // *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. – 2026. – Vol. 212. – №. 1. – P. 24–44.
10. Dynorphin A 1-17 biotransformation in inflamed tissue, serum and trypsin solution analysed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry / M. Morgan, H. M. Herath, P. J. Cabot [et al.] // *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. – 2012. – Vol. 404. – №. 10. – P. 3111–3121.
11. The efficacy of Dynorphin fragments at the κ , μ and δ opioid receptor in transfected HEK cells and in an animal model of unilateral peripheral inflammation / M. Morgan, A. Heffernan, F. Benhabib [et al.] // *Peptides*. – 2017. – Vol. 89. – P. 9–16.
12. Peripheral opioid receptors mediating antinociception in inflammation. Evidence for involvement of mu, delta and kappa receptors / C. Stein, M. J. Millan, T. S. Shippenberg [et al.] // *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. – 1989. – Vol. 248. – №. 3. – P. 1269–1275.
13. Dynorphin 1-17 and Its N-Terminal Biotransformation Fragments Modulate Lipopolysaccharide-Stimulated Nuclear Factor-kappa B Nuclear Translocation, Interleukin-1beta and Tumor Necrosis Factor-alpha in Differentiated THP-1 Cells / S. S. Fazalul Rahiman, M. Morgan, P. Gray [et al.] // *PLoS One*. – 2016. – Vol. 11. – №. 4. – P. 0153005.
14. Dynorphin 1-17 biotransformation peptides: properties, challenges and solutions for future therapeutics development / R. Ballouze, S. M. Salhimi, N. Mohtar [et al.] // *Future Medicinal Chemistry*. – 2023. – Vol. 15. – №. 9. – P. 791–808.
15. [D-Ala2, D-Leu5] enkephalin inhibits TLR4/NF- κ B signaling pathway and protects rat brains against focal ischemia-reperfusion injury / D. Fu, H. Liu, J. Zhu [et al.] // *Mediators of Inflammation*. – 2021. – Vol. 2021. – P. 6661620.
16. Delayed administration of D-Ala2-D-Leu5-enkephalin, a delta-opioid receptor agonist, improves survival in a rat model of sepsis / C. W. Tang, W. M. Feng, H. M. Du [et al.] // *The Tohoku Journal of Experimental Medicine*. – 2011. – Vol. 224. – №. 1. – P. 69–76.

17. Inhaled [D-Ala²]-Dynorphin 1-6 Prevents Hyperacetylation and Release of High Mobility Group Box 1 in a Mouse Model of Acute Lung Injury / V. N. Karkischenko, V. I. Skvortsova, M. T. Gasanov [et al.] // *Journal of Immunology Research*. – 2021. – Vol. 2021. – P. 4414544.
18. Лейтрагин подавляет экспрессию цитокинов, включая интерлейкин-6, в модели «цитокинового шторма» у мышей линии C57BL/6Y с индуцированным острым респираторным дистресс-синдромом / В. Н. Каркищенко, И. А. Помыткин, Н. В. Петрова [и др.] // *Биомедицина*. – 2020. – Т. 16, № 4. – С. 34–43.
19. Гейн, С. В. Динорфины в регуляции функций иммунной системы (обзор) / С. В. Гейн // *Биохимия*. – 2014. – Т. 79. – № 5. – С. 509–519.
20. Bruijnzeel, A. W. kappa-Opioid receptor signaling and brain reward function / A. W. Bruijnzeel // *Brain Research Reviews*. – 2009. – Vol. 62. – №. 1. – P. 127–146.
21. Dynorphin-(1-13), an extraordinarily potent opioid peptide / A. Goldstein, S. Tachibana, L. I. Lowney [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 1979. – Vol. 76. – №. 12. – P. 6666–6670.
22. Porcine pituitary dynorphin: complete amino acid sequence of the biologically active heptadecapeptide / A. Goldstein, W. Fischli, L. I. Lowney [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 1981. – Vol. 78. – №. 11. – P. 7219–7223.
23. Chavkin, C. Dynorphin--still an extraordinarily potent opioid peptide / C. Chavkin // *Molecular Pharmacology*. – 2013. – Vol. 83. – №. 4. – P. 729–736.
24. Dynorphin, a preferential ligand for kappa-opioid receptors, is present in nerve fibers and immune cells within inflamed tissue of the rat / A. H. Hassan, R. Pzewlocki, A. Herz [et al.] // *Neuroscience Letters*. – 1992. – Vol. 140. – №. 1. – P. 85–88.
25. Schwarzer, C. 30 years of dynorphins--new insights on their functions in neuropsychiatric diseases / C. Schwarzer // *Pharmacology & Therapeutics*. – 2009. – Vol. 123. – №. 3. – P. 353–370.
26. Dixon, D. M. Formation of [Leu⁵]enkephalin from dynorphin A(1-8) by rat central nervous tissue in vitro / D. M. Dixon, J. R. Traynor // *Journal of Neurochemistry*. – 1990. – Vol. 54. – №. 4. – P. 1379–1385.

27. Dixon, D. M. Evidence that the agonist action of dynorphin A(1-8) in the guinea-pig myenteric-plexus may be mediated partly through conversion to [Leu5]enkephalin / D. M. Dixon, J. R. Traynor // *British Journal of Pharmacology*. – 1990. – Vol. 101. – №. 3. – P. 674–678.
28. Dixon, D. M. Conversion of dynorphin A(1-8) to [Leu5]-enkephalin in rat central nervous tissue during development / D. M. Dixon, J. R. Traynor // *Neuropeptides*. – 1993. – Vol. 25. – №. 2. – P. 121–125.
29. Enkephalin is liberated from metorphamide and dynorphin A1-8 by endo-oligopeptidase A, but not by EC 3.4.24.15 / O. Toffoletto, A. C. Camargo, E. B. Oliveira [et al.] // *Biochemical Journal*. – 1988. – Vol. 252. – №. 1. – P. 35–38.
30. Kerr, M. A. The purification and specificity of a neutral endopeptidase from rabbit kidney brush border / M. A. Kerr, A. J. Kenny // *The Biochemical Journal*. – 1974. – Vol. 137. – №. 3. – P. 477–488.
31. Substance P and [Leu]enkephalin are hydrolyzed by an enzyme in pig caudate synaptic membranes that is identical with the endopeptidase of kidney microvilli / R. Matsas, I. S. Fulcher, A. J. Kenny [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 1983. – Vol. 80. – №. 10. – P. 3111–3115.
32. Nalivaeva, N. N. Neprilysin expression and functions in development, ageing and disease / N. N. Nalivaeva, I. A. Zhuravin, A. J. Turner // *Mechanisms of Ageing and Development*. – 2020. – Vol. 192. – P. 111363.
33. Smith, A. P. Pharmacology of dynorphin / A. P. Smith, N. M. Lee // *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. – 1988. – Vol. 28. – P. 123–140.
34. Therapeutic peptides: current applications and future directions / L. Wang, N. Wang, W. Zhang [et al.] // *Signal Transduction and Targeted Therapy*. – 2022. – Vol. 7. – №. 1. – P. 48.
35. Development of Peptide Biopharmaceuticals in Russia / V. I. Deigin, V. A. Vinogradov, O. Y. Serova [et al.] // *Pharmaceutics*. – 2022. – Vol. 14. – №. 4. – P. 716.
36. Dynorphin and dynorphin are ligands for the kappa-subtype of opiate receptor / A. D. Corbett, S. J. Paterson, A. T. McKnight [et al.] // *Nature*. – 1982. – Vol. 299. – №. 5878. – P. 79–81.

37. Yarigin, K. N. The interactions of opioids with enterocytes membranes: evidence for enzyme-catalysed covalent binding / K. N. Yarigin // Collection of Czechoslovak Chemical Communications. – 1990. – Vol. 55. – P. 2328–2338.
38. Титов, М. И. Даларгин — пептидный препарат с цитопротективным действием / М. И. Титов, В. А. Виноградов, Ж. Д. Беспалова // Бюллетень Всесоюзного кардиологического научного центра АМН СССР. – 1985. – № 2. – С. 72–76.
39. Виноградов, В. А. Даларгин — первый аналог энкефалинов, применяемых в гастроэнтерологии / В. А. Виноградов, В. М. Полонский // Терапевтический архив. – 1988. – Т. 60. – № 8. – С. 147–153.
40. Влияние даларгина при лечении и профилактике НПВП-гастропатий на выраженность оксидативного стресса и процессов апоптоза в слизистой оболочке желудка (экспериментально-клиническое исследование) / Е. Ю. Животова, Н. А. Болоняева, М. Ю. Флейшман [и др.] // Дальневосточный медицинский журнал. – 2011. – № 4. – С. 72–76.
41. Влияние даларгина на репаративную способность слизистой оболочки желудочно-кишечного тракта при различных гастроэнтерологических заболеваниях / С. А. Алексеенко, С. С. Тимошин, Н. А. Болоняева [и др.] // Дальневосточный медицинский журнал. – 2010. – № 3. – С. 64–67.
42. Участие регуляторных пептидов в регуляции тканевого гомеостаза в формировании состава желудка / Е. Ю. Животова, О. А. Лебедько, М. Ю. Флейшман [и др.] // Дальневосточный медицинский журнал. – 2013. – № 1. – С. 79–82.
43. Применение даларгина для профилактики и лечения НПВП-гастропатий / Н. А. Болоняева, Е. Ю. Животова, М. Ю. Флейшман [и др.] // Дальневосточный медицинский журнал. – 2005. – № 2. – С. 51–53.
44. Система NOS-NO универсальное звено в реализации гастропротективных эффектов опиоидных пептидов / Е. Ю. Животова, Н. В. Масленникова, М. Ю. Флейшман [и др.] // Дальневосточный медицинский журнал. – 2011. – № 4. – С. 85–88.

45. Оценка эффективности даларгина в лечении постгастрорезекционного панкреатита / Я. И. Григус, О. Д. Михайлова, В. Ф. Булычев [и др.] // ПМ. – 2012. – № 3 (58). – С. 46–49.
46. Булгаков, С. А. Синтетический опиоидный пептид даларгин в лечении хронического алкогольного панкреатита / С. А. Булгаков // Вестник современной клинической медицины. – 2010. – Т. 3. – № 1. – С. 34–36.
47. Балачевский, Б. В. Воздействие даларгина на функционально-метаболическую активность нейтрофилов крови при остром экспериментальном панкреатите / Б. В. Балачевский, А. Н. Курзанов, А. А. Славинский // Кубанский научный медицинский вестник. – 2006. – № 10. – С. 18–20.
48. Морфофункциональные изменения поджелудочной железы под влиянием даларгина в норме и при экспериментальном панкреатите / А. Н. Курзанов, Г. П. Титова, В. А. Виноградов [и др.] // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 1988. – Т. 105, № 4. – С. 445–447.
49. Влияние даларгина на содержание матриксных металлопротеиназ и тканевого ингибитора металлопротеиназ в толстом кишечнике мышей с экспериментальным язвенным колитом / А. Ю. Ляшев, Г. С. Маль, Е. Б. Артюшкова [и др.] // Научные результаты биомедицинских исследований. – 2024. – Т. 10. – № 4. – С. 456–468.
50. Ляшев, А. Ю. Влияние аналога лей-энкефалина на содержание про- и противовоспалительных цитокинов в стенке толстого кишечника при экспериментальном язвенном колите / А. Ю. Ляшев, Г. С. Маль // Иммунология. – 2024. – Т. 45. – № 1. – С. 52–59.
51. Применение даларгина в комплексной терапии болезни Крона / Е. В. Ожегов, С. А. Алексеенко, О. А. Лебедько [и др.] // Дальневосточный медицинский журнал. – 2009. – № 2. – С. 86–89.
52. Анализ Даларгина на гематологические индексы у мышей с экспериментальным язвенным колитом / А. Ю. Ляшев, Г. С. Маль, М. А. Затолокина [и др.] // Вестник Волгоградского государственного медицинского университета. – 2025. – № 1. – С. 112–117.

53. Ляшев, А. Ю. Влияние даларгина на фагоцитарную активность нейтрофилов при экспериментальном язвенном колите у мышей / А. Ю. Ляшев, Г. С. Маль // Вестник Смоленской государственной медицинской академии. – 2024. – Т. 23. – № 3. – С. 89–94.
54. Жавненко, М. Ю. Применение даларгина в комплексной терапии синдрома раздраженного кишечника с диареей и избыточным бактериальным ростом / М. Ю. Жавненко, О. В. Крапивная, С. А. Алексеенко // ПМ. – 2011. – № 50. – С. 78–81.
55. К механизмам антиконстрикторного эффекта даларгина / Н. А. Бебякова, С. Н. Левицкий, Т. М. Командресова [и др.] // Arctic Environmental Research. – 2012. – № 1. – С. 34–39.
56. Донцов, А. В. Возможности даларгина в лечении больных ИБС / А. В. Донцов // Вестник новых медицинских технологий. – 2012. – Т. 19. – № 3. – С. 42–44.
57. Донцов, А. В. Эффективность даларгина в коррекции цитокинового профиля при больных ИБС и метаболическим синдромом / А. В. Донцов // Человек и его здоровье. – 2013. – № 1. – С. 28–32.
58. Кардиоваскулярные эффекты даларгина в условиях острого стресса / Н. А. Бебякова, С. Н. Левицкий, А. В. Хромова [и др.] // Международный научно-исследовательский журнал. – 2014. – № 8-1 (27). – С. 112–115.
59. Малышев, Ю. П. Гемодинамические эффекты даларгина при разных видах анестезии у больных с сопутствующими сердечно-сосудистыми заболеваниями / Ю. П. Малышев, К. А. Долмова // Кубанский научный медицинский вестник. – 2011. – № 3. – С. 112–115.
60. Донцов, А. В. Комплексная коррекция дислипидемии у больных ИБС с метаболическим синдромом / А. В. Донцов // Актуальные проблемы медицины. – 2013. – № 25 (168). – С. 78–82.
61. Сравнительная эффективность применения электросна в сочетании с даларгином в медицинской реабилитации пациентов с ишемической болезнью сердца / В. И. Мизин, В. В. Ежов, Т. С. Яновский [и др.] // Крымский журнал экспериментальной и клинической медицины. – 2022. – Т. 12. – № 3. – С. 45–51.

62. Забродин, О. Н. К норадренергическому компоненту механизмов стресс-лимитирующего и заживляющего эффектов даларгина / О. Н. Забродин // *Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии.* – 2016. – Т. 14. – № 4. – С. 44–48.
63. Назаров, И. П. Применение стресс протекторных и адаптогенных препаратов в периоперационном периоде у больных, оперированных по поводу диффузно-токсического зоба / И. П. Назаров, С. В. Сорсунов // *Бюллетень медицинской науки.* – 2006. – № 2. – С. 58–61.
64. Роль агониста периферических опиатных рецепторов в патогенезе ушиба сердца у крыс с различной стрессустойчивостью / А. Б. Приймак, О. В. Корпачева, А. Н. Золотов [и др.] // *Фундаментальная и клиническая медицина.* – 2022. – Т. 7. – № 2. – С. 34–41.
65. Тирозил-Далан Исследование глицилфенилаланил-лейциларгинина диацетата (Даларгин) на окислительный стресс у пациентов с легкой сочетанной травмой: проспективное клиническое исследование / В. В. Антонова, А. К. Евсеев, И. В. Горончаровская [и др.] // *Вестник интенсивной терапии имени А. И. Салтанова.* – 2023. – № 4. – С. 56–64.
66. Шлозников, Б. М. Даларгин — дальнейшее смягчение интраоперационной защиты больного при коррекции дефекта межпредсердной перегородки в условиях искусственного кровообращения: новый метод анестезии / Б. М. Шлозников, В. В. Лихванцев, А. Ю. Кузнецов // *Анестезиология и реаниматология.* – 1989. – № 4. – С. 21–25.
67. Опиоидное прекондиционирование в эксперименте и клинике / В. В. Лихванцев, А. А. Шапошников, О. А. Гребенчиков [и др.] // *Вестник анестезиологии и реаниматологии.* – 2013. – Т. 10, № 3. – С. 3–9.
68. Влияние даларгина и ремаксола на эндокринно-метаболические нарушения у пациентов с торакоабдоминальной травмой / А. Г. Мирошниченко, Р. М. Рахманов, М. А. Большакова [и др.] // *Вестник анестезиологии и реаниматологии.* – 2021. – Т. 18. – № 2. – С. 28–35.

69. Глазунова, И. Б. Влияние даларгина на эффективность терапии атопического дерматита / И. Б. Глазунова, Л. В. Силина, И. И. Бобынцев // Человек и его здоровье. – 2008. – № 3. – С. 46–49.
70. Козулин, Е. Е. Даларгин и этапная корнеотерапия больных атопическим дерматитом / Е. Е. Козулин, С. Г. Лыкова // Дальневосточный медицинский журнал. – 2007. – № 3. – С. 74–76.
71. Боровская, Т. Ф. Опыт использования даларгина в лечении больных внебольничной пневмонией / Т. Ф. Боровская, Э. Х. Курпас, С. Н. Гориславец // Бюллетень физиологии и патологии дыхания. – 2004. – № 18. – С. 46–48.
72. Украинская, Л. А. Коррекция даларгином и а-токоферолом стресс-индуцированных нарушений структуры лёгких / Л. А. Украинская, Л. С. Васильева // Бюллетень медицинской науки. – 2002. – № 1. – С. 56–59.
73. Синтетический аналог лей-энкефалина при COVID-19 (проспективное клиническое исследование) / М. А. Магомедов, Н. Г. Бурда, З. Ф. Мисиков [и др.] // Общая реаниматология. – 2022. – Т. 18. – № 4. – С. 12–20.
74. Применение опиоидного пептида DSLET при острых токсических гепатопатиях / И. И. Бобынцев, А. И. Конопля, Л. А. Северьянова [и др.] // Вестник новых медицинских технологий. – 2006. – Т. 13. – № 1. – С. 89–91.
75. Analgesia produced by E-2078, a systemically active dynorphin analog, in mice / T. Nakazawa, Y. Furuya, T. Kaneko [et al.] // The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics. – 1990. – Vol. 252. – № 3. – P. 1247–1254.
76. Патент РФ № RU 2760133C1. Амиды гептапептида для лечения HMGB1-зависимых заболеваний: № 2021111474: заявл. 22.04.2021: опубл. 22.11.2021 / Каркищенко В. Н., Скворцова В. И., Помыткин И. А., Каркищенко Н. Н. – С. 20.
77. Beyer, A. Antinociceptive effects of dynorphin peptides in a model of inflammatory pain / A. Beyer, M. Schafer, C. Stein // Pain. – 1997. – Vol. 70. – №. 2-3. – P. 141–147.
78. Local inhibitory effects of dynorphin A-(1-17) on capsaicin-induced thermal allodynia in rhesus monkeys / M. C. Ko, K. J. Willmont, A. Burrirt [et al.] // European Journal of Pharmacology. – 2000. – Vol. 402. – № 1-2. – P. 69–76.

79. Methionine-enkephalin-and Dynorphin A release from immune cells and control of inflammatory pain / P. J. Cabot, L. Carter, M. Schafer [et al.] // *Pain*. – 2001. – Vol. 93. – № 3. – P. 207–212.
80. Schafer, M. Interleukin 1 beta and corticotropin-releasing factor inhibit pain by releasing opioids from immune cells in inflamed tissue / M. Schafer, L. Carter, C. Stein // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 1994. – Vol. 91. – № 10. – P. 4219–4223.
81. Toll-like receptor 4 (TLR4)/opioid receptor pathway crosstalk and impact on opioid analgesia, immune function, and gastrointestinal motility / P. Zhang, M. Yang, C. Chen [et al.] // *Frontiers in Immunology*. – 2020. – Vol. 11. – P. 1455.
82. Increased tumor necrosis factor- α and nitric oxide production by rat macrophages following in vitro stimulation and intravenous administration of the δ -opioid agonist SNC 80 / R. Gomez-Flores, K. C. Rice, X. Zhang [et al.] // *Life Sciences*. – 2001. – Vol. 68. – № 24. – P. 2675–2684.
83. Лейтрагин повышает выживаемость животных в модели фатального острого респираторного дистресс-синдрома при профилактическом и лечебном режимах введения / В. Н. Каркищенко, И. А. Помыткин, М. Т. Гасанов [и др.] // *Биомедицина*. – 2020. – Т. 16. – № 4. – С. 44–51.
84. Сочетанное применение лейтрагина и легочного сурфактанта-БЛ повышает выживаемость животных в модели фатального острого респираторного дистресс-синдрома / В. Н. Каркищенко, И. А. Помыткин, М. Т. Гасанов [и др.] // *Биомедицина*. – 2020. – Т. 16. – № 4. – С. 52–59.
85. HMGB1 in health and disease / R. Kang, R. Chen, Q. Zhang [et al.] // *Molecular Aspects of Medicine*. – 2014. – Vol. 40. – P. 1–116.
86. High-mobility group box 1 is a novel deacetylation target of Sirtuin1 / M. M. Rabadi, S. Xavier, R. Vasko [et al.] // *Kidney International*. – 2015. – Vol. 87. – № 1. – P. 95–108.
87. Донцов, А. В. Влияние дефицита эндогенных нейропептидов на течение ишемической болезни сердца / А. В. Донцов // *Клиническая медицина*. – 2017. – Т. 95. – № 2. – С. 127–131.

88. Modulation of NF-kappaB-dependent transcription and cell survival by the SIRT1 deacetylase / F. Yeung, J. E. Hoberg, C. S. Ramsey [et al.] // *The EMBO Journal*. – 2004. – Vol. 23. – № 12. – P. 2369–2380.
89. Histone deacetylases (HDACs): characterization of the classical HDAC family / A. J. de Ruijter, A. H. van Gennip, H. N. Caron [et al.] // *The Biochemical Journal*. – 2003. – Vol. 370, Pt 3. – P. 737–749.
90. Evolutionarily conserved and nonconserved cellular localizations and functions of human SIRT proteins / E. Michishita, J. Y. Park, J. M. Burneskis [et al.] // *Molecular Biology of the Cell*. – 2005. – Vol. 16. – № 10. – P. 4623–4635.
91. Identifying Human SIRT1 Substrates by Integrating Heterogeneous Information from Various Sources / Z. Zhai, M. Tang, Y. Yang [et al.] // *Scientific Reports*. – 2017. – Vol. 7. – № 1. – P. 4614.
92. Human SirT1 interacts with histone H1 and promotes formation of facultative heterochromatin / A. Vaquero, M. Scher, D. Lee [et al.] // *Molecular Cell*. – 2004. – Vol. 16. – № 1. – P. 93–105.
93. Shahbazian, M. D. Functions of site-specific histone acetylation and deacetylation / M. D. Shahbazian, M. Grunstein // *Annual Review of Biochemistry*. – 2007. – Vol. 76. – P. 75–100.
94. Vaquero, A. NAD⁺-dependent deacetylation of H4 lysine 16 by class III HDACs / A. Vaquero, R. Sternglanz, D. Reinberg // *Oncogene*. – 2007. – Vol. 26. – № 37. – P. 5505–5520.
95. Sirtuin 1 modulates cellular responses to hypoxia by deacetylating hypoxia-inducible factor 1alpha / J. H. Lim, Y. M. Lee, Y. S. Chun [et al.] // *Molecular Cell*. – 2010. – Vol. 38. – № 6. – P. 864–878.
96. Sirt1 deacetylates c-Myc and promotes c-Myc/Max association / B. Mao, G. Zhao, X. Lv [et al.] // *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. – 2011. – Vol. 43. – № 11. – P. 1573–1581.
97. Fan, W. The SIRT1-c-Myc axis in regulation of stem cells / W. Fan, X. Li // *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. – 2023. – Vol. 11. – P. 1236968.

98. Interactions between E2F1 and SirT1 regulate apoptotic response to DNA damage / C. Wang, L. Chen, X. Hou [et al.] // *Nature Cell Biology*. – 2006. – Vol. 8. – № 9. – P. 1025–1031.
99. Suppression of FOXO1 activity by FHL2 through SIRT1-mediated deacetylation / Y. Yang, H. Hou, E. M. Haller [et al.] // *The EMBO Journal*. – 2005. – Vol. 24. – № 5. – P. 1021–1032.
100. Negative control of p53 by Sir2alpha promotes cell survival under stress / J. Luo, A. Y. Nikolaev, S. Imai [et al.] // *Cell*. – 2001. – Vol. 107. – № 2. – P. 137–148.
101. Stress-dependent regulation of FOXO transcription factors by the SIRT1 deacetylase / A. Brunet, L. B. Sweeney, J. F. Sturgill [et al.] // *Science*. – 2004. – Vol. 303. – № 5666. – P. 2011–2015.
102. SirT1 regulation of antioxidant genes is dependent on the formation of a FoxO3a/PGC-1 α complex / Y. Olmos, F. J. Sánchez-Gómez, B. Wild [et al.] // *Antioxidants & Redox Signaling*. – 2013. – Vol. 19. – № 13. – P. 1507–1521.
103. FOXO4 is acetylated upon peroxide stress and deacetylated by the longevity protein hSir2(SIRT1) / A. van der Horst, L. G. Tertoolen, L. M. de Vries-Smits [et al.] // *The Journal of Biological Chemistry*. – 2004. – Vol. 279. – № 28. – P. 28873–28879.
104. Metabolic control of muscle mitochondrial function and fatty acid oxidation through SIRT1/PGC-1alpha / Z. Gerhart-Hines, J. T. Rodgers, O. Bare [et al.] // *The EMBO Journal*. – 2007. – Vol. 26. – № 7. – P. 1913–1923.
105. SIRT1 deacetylates and inhibits SREBP-1C activity in regulation of hepatic lipid metabolism / B. Ponugoti, D. H. Kim, Z. Xiao [et al.] // *The Journal of Biological Chemistry*. – 2010. – Vol. 285. – № 44. – P. 33959–33970.
106. Sirt1 promotes fat mobilization in white adipocytes by repressing PPAR-gamma / F. Picard, M. Kurtev, N. Chung [et al.] // *Nature*. – 2004. – Vol. 429. – № 6993. – P. 771–776.
107. SIRT1 promotes DNA repair activity and deacetylation of Ku70 / J. Jeong, K. Juhn, H. Lee [et al.] // *Experimental & Molecular Medicine*. – 2007. – Vol. 39. – № 1. – P. 8–13.

108. Man, A. W. C. The Role of Sirtuin1 in Regulating Endothelial Function, Arterial Remodeling and Vascular Aging / A. W. C. Man, H. Li, N. Xia // *Frontiers in Physiology*. – 2019. – Vol. 10. – P. 1173.
109. High-mobility group box 1 is a novel deacetylation target of Sirtuin1 / M. M. Rabadi, S. Xavier, R. Vasko [et al.] // *Kidney International*. – 2015. – Vol. 87. – № 1. – P. 95–108.
110. Wulandari, S. The role of HMGB1 in COVID-19-induced cytokine storm and its potential therapeutic targets: A review / S. Wulandari, Hartono, T. Wibawa // *Immunology*. – 2023. – Vol. 169. – № 2. – P. 117–131.
111. Quantitative acetylome analysis reveals the roles of SIRT1 in regulating diverse substrates and cellular pathways / Y. Chen, W. Zhao, J. S. Yang [et al.] // *Molecular & Cellular Proteomics*. – 2012. – Vol. 11. – № 10. – P. 1048–1062.
112. Quantitative proteomic analysis of the lysine acetylome reveals diverse SIRT2 substrates / H. Zhang, E. B. Dammer, D. M. Duong [et al.] // *Scientific Reports*. – 2022. – Vol. 12. – № 1. – P. 3822.
113. The human Sir2 ortholog, SIRT2, is an NAD⁺-dependent tubulin deacetylase / B. J. North, B. L. Marshall, M. T. Borra [et al.] // *Molecular Cell*. – 2003. – Vol. 11. – № 2. – P. 437–444.
114. Acetylation of PAX7 controls muscle stem cell self-renewal and differentiation potential in mice / M. C. Sincennes, C. E. Brun, A. Y. T. Lin [et al.] // *Nature Communications*. – 2021. – Vol. 12. – № 1. – P. 3253.
115. SIRT2 regulates NF- κ B dependent gene expression through deacetylation of p65 Lys310 / K. M. Rothgiesser, S. Erener, S. Waibel [et al.] // *Journal of Cell Science*. – 2010. – Vol. 123. – № 24. – P. 4251–4258.
116. SIRT2 regulates high mobility group protein B1 nucleoplasmic shuttle and degradation via deacetylation in microglia / W. Q. Xing, X. J. Piao, Q. Han [et al.] // *Journal of Cellular Physiology*. – 2024. – Vol. 239. – № 11. – P. e31364.
117. Mitochondrial Sirtuin Network Reveals Dynamic SIRT3-Dependent Deacetylation in Response to Membrane Depolarization / W. Yang, K. Nagasawa, C. Münch [et al.] // *Cell*. – 2016. – Vol. 167. – № 4. – P. 985–1000.e21.

118. Sirt4: A Multifaceted Enzyme at the Crossroads of Mitochondrial Metabolism and Cancer / D. Tomaselli, C. Steegborn, A. Mai [et al.] // *Frontiers in Oncology*. – 2020. – Vol. 10. – P. 474.
119. Emerging roles of mitochondrial sirtuin SIRT5 in succinylation modification and cancer development / Z. Ke, K. Shen, L. Wang [et al.] // *Frontiers in Immunology*. – 2025. – Vol. 16. – P. 1531246.
120. Khan, R. I. A Review of the Recent Advances Made with SIRT6 and its Implications on Aging Related Processes, Major Human Diseases, and Possible Therapeutic Targets / R. I. Khan, S. S. R. Nirzhor, R. Akter // *Biomolecules*. – 2018. – Vol. 8. – № 3. – P. 44.
121. SIRT6 links histone H3 lysine 9 deacetylation to NF-kappaB-dependent gene expression and organismal life span / T. L. Kawahara, E. Michishita, A. S. Adler [et al.] // *Cell*. – 2009. – Vol. 136. – № 1. – P. 62–74.
122. Unraveling the multifaceted role of SIRT7 and its therapeutic potential in human diseases / H. Li, Z. Yuan, J. Wu, J. Lu [et al.] // *International Journal of Biological Macromolecules*. – 2024. – Vol. 279. – № 2. – P. 135210.
123. Mitchell, S. Signaling via the NFκB system / S. Mitchell, J. Vargas, A. Hoffmann // *Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine*. – 2016. – Vol. 8. – № 3. – P. 227–241.
124. NF-κB signaling in inflammation / T. Liu, L. Zhang, D. Joo [et al.] // *Signal Transduction and Targeted Therapy*. – 2017. – Vol. 2. – P. 17023.
125. A critical role of TAK1 in B-cell receptor-mediated nuclear factor kappaB activation / J. Schuman, Y. Chen, A. Podd [et al.] // *Blood*. – 2009. – Vol. 113. – № 19. – P. 4566–4574.
126. Essential role of TAK1 in thymocyte development and activation / H. H. Liu, M. Xie, M. D. Schneider [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2006. – Vol. 103. – № 31. – P. 11677–11682.
127. The kinase TAK1 can activate the NIK-I kappaB as well as the MAP kinase cascade in the IL-1 signalling pathway / J. Ninomiya-Tsuji, K. Kishimoto, A. Hiyama [et al.] // *Nature*. – 1999. – Vol. 398. – № 6724. – P. 252–256.

128. Activation of IKK by TNFalpha requires site-specific ubiquitination of RIP1 and polyubiquitin binding by NEMO / C. K. Ea, L. Deng, Z. P. Xia [et al.] // *Molecular Cell*. – 2006. – Vol. 22. – № 2. – P. 245–257.
129. The role of nuclear factor kappaB in tumor necrosis factor-regulated transcription of the human mu-opioid receptor gene / J. Kraus, C. Börner, E. Giannini [et al.] // *Molecular Pharmacology*. – 2003. – Vol. 64. – № 4. – P. 876–884.
130. Chen, Y. L. Sustained activation of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/nuclear factor kappaB signaling mediates G protein-coupled delta-opioid receptor gene expression / Y. L. Chen, P. Y. Law, H. H. Loh // *The Journal of Biological Chemistry*. – 2006. – Vol. 281. – № 6. – P. 3067–3074.
131. Law, P. Y. Insights into the receptor transcription and signaling: implications in opioid tolerance and dependence / P. Y. Law, H. H. Loh, L. N. Wei // *Neuropharmacology*. – 2004. – Vol. 47, Suppl 1. – P. 300–311.
132. Bakalkin, G. Prodynorphin gene expression relates to NF-kappa B factors / G. Bakalkin, T. Yakovleva, L. Terenius // *Molecular Brain Research*. – 1994. – Vol. 24. – № 1-4. – P. 301–312.
133. Role of toll-like receptors in pulmonary immunity: mechanisms and therapeutic implications / Z. Qu, Z. Guo, C. Yang [et al.] // *Frontiers in Immunology*. – 2025. – Vol. 16. – P. 1682649.
134. Activation of airway epithelial cells by toll-like receptor agonists / Q. Sha, A. Q. Truong-Tran, J. R. Plitt [et al.] // *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*. – 2004. – Vol. 31. – № 3. – P. 358–364.
135. Toll-like receptor mRNA levels in alveolar macrophages after inhalation of endotoxin / N. A. Maris, M. C. Dessing, A. F. de Vos [et al.] // *The European Respiratory Journal*. – 2006. – Vol. 28. – № 3. – P. 622–626.
136. Endothelium-derived Toll-like receptor-4 is the key molecule in LPS-induced neutrophil sequestration into lungs / G. Andonegui, C. S. Bonder, F. Green [et al.] // *The Journal of Clinical Investigation*. – 2003. – Vol. 111. – № 7. – P. 1011–1020.

137. Lafferty, E. I. The role of toll-like receptors in acute and chronic lung inflammation / E. I. Lafferty, S. T. Qureshi, M. Schnare // *Journal of Inflammation (London)*. – 2010. – Vol. 7. – P. 57.
138. The role of TLR4/NF- κ B signaling axis in pneumonia: from molecular mechanisms to regulation by phytochemicals / J. Yin, J. Huang, P. Zhoum [et al.] // *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*. – 2025. – Vol. 398. – № 11. – P. 14559–14588.
139. The TLR4-MyD88 Signaling Axis Regulates Lung Monocyte Differentiation Pathways in Response to *Streptococcus pneumoniae* / R. Sánchez-Tarjuelo, I. Cortegano, J. Manosalva [et al.] // *Frontiers in Immunology*. – 2020. – Vol. 11. – P. 2120.
140. *Staphylococcus aureus* increases Prostaglandin E2 secretion in cow neutrophils by activating TLR2, TLR4, and NLRP3 inflammasome signaling pathways / K. Zhang, Y. Jia, Y. Qian [et al.] // *Frontiers in Microbiology*. – 2023. – Vol. 14. – P. 1163261.
141. Interplay of TLR4 and SARS-CoV-2: Unveiling the Complex Mechanisms of Inflammation and Severity in COVID-19 Infections / C. N. Asaba, C. J. Ekabe, H. Ayuk [et al.] // *Journal of Inflammation Research*. – 2024. – Vol. 17. – P. 5077–5091.
142. Beutler, B. Identification of Toll-like receptor 4 (Tlr4) as the sole conduit for LPS signal transduction: genetic and evolutionary studies / B. Beutler, X. Du, A. Poltorak // *Journal of Endotoxin Research*. – 2001. – Vol. 7. – № 4. – P. 277–280.
143. MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4 / R. Shimazu, S. Akashi, H. Ogata [et al.] // *The Journal of Experimental Medicine*. – 1999. – Vol. 189. – № 11. – P. 1777–1782.
144. The structural basis of lipopolysaccharide recognition by the TLR4-MD-2 complex / B. S. Park, D. H. Song, H. M. Kim [et al.] // *Nature*. – 2009. – Vol. 458. – № 7242. – P. 1191–1195.
145. Toll-like receptor 4 (TLR4): new insight immune and aging / H. J. Kim, H. Kim, J. H. Lee [et al.] // *Immunity & Ageing*. – 2023. – Vol. 20. – № 1. – P. 67.
146. Le, J. Role of toll-like receptors and nod-like receptors in acute lung infection / J. Le, Y. Kulatheepan, S. Jeyaseelan // *Frontiers in Immunology*. – 2023. – Vol. 14. – P. 1249098.

147. Critical role of RIG-I-like receptors in inflammation in chronic obstructive pulmonary disease / Q. Zhang, H. Wan, S. Huang [et al.] // *The Clinical Respiratory Journal*. – 2016. – Vol. 10. – № 1. – P. 22–31.
148. NF- κ B in biology and targeted therapy: new insights and translational implications / Q. Guo, Y. Jin, X. Chen [et al.] // *Signal Transduction and Targeted Therapy*. – 2024. – Vol. 9. – № 1. – P. 53.
149. Chen, L. F. Shaping the nuclear action of NF-kappaB / L. F. Chen, W. C. Greene // *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. – 2004. – Vol. 5. – № 5. – P. 392–401.
150. Chen, L. F. Acetylation of RelA at discrete sites regulates distinct nuclear functions of NF-kappaB / L. F. Chen, Y. Mu, W. C. Greene // *The EMBO Journal*. – 2002. – Vol. 21. – № 23. – P. 6539–6548.
151. Post-activation turn-off of NF-kappa B-dependent transcription is regulated by acetylation of p65 / R. Kiernan, V. Brès, R. W. Ng [et al.] // *The Journal of Biological Chemistry*. – 2003. – Vol. 278. – № 4. – P. 2758–2766.
152. Duration of nuclear NF-kappaB action regulated by reversible acetylation / L. F. Chen, W. Fischle, E. Verdin [et al.] // *Science*. – 2001. – Vol. 293. – № 5535. – P. 1653–1657.
153. CREB-binding protein/p300 are transcriptional coactivators of p65 / M. E. Gerritsen, A. J. Williams, A. S. Neishm [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 1997. – Vol. 94. – № 7. – P. 2927–2932.
154. Transcriptional activation by NF-kappaB requires multiple coactivators / K. A. Sheppard, D. W. Rose, Z. K. Haque [et al.] // *Molecular and Cellular Biology*. – 1999. – Vol. 19. – № 9. – P. 6367–6378.
155. Rothgiesser, K. M. Acetylation of p65 at lysine 314 is important for late NF-kappaB-dependent gene expression / K. M. Rothgiesser, M. Fey, M. O. Hottiger // *BMC Genomics*. – 2010. – Vol. 11. – P. 22.
156. Steroid receptor coactivator-1 interacts with the p50 subunit and coactivates nuclear factor kappaB-mediated transactivations / S. Y. Na, S. K. Lee, S. J. Han [et al.] // *The Journal of Biological Chemistry*. – 1998. – Vol. 273. – № 18. – P. 10831–10834.

157. Enhancement of nuclear factor-kappa B acetylation by coactivator p300 and HIV-1 Tat proteins / B. Furia, L. Deng, K. Wu [et al.] // *The Journal of Biological Chemistry*. – 2002. – Vol. 277. – № 7. – P. 4973–4980.
158. Deng, W. G. Up-regulation of p300 binding and p50 acetylation in tumor necrosis factor-alpha-induced cyclooxygenase-2 promoter activation / W. G. Deng, Y. Zhu, K. K. Wu // *The Journal of Biological Chemistry*. – 2003. – Vol. 278. – № 7. – P. 4770–4777.
159. Acetylation of p65Lys310 by p300 in macrophages mediates anti-inflammatory property of berberine / S. Zhang, P. Xu, Z. Zhu [et al.] // *Redox Biology*. – 2023. – Vol. 62. – P. 102704.
160. Greene, W. C. Regulation of NF-kappaB action by reversible acetylation / W. C. Greene, L. F. Chen // *Novartis Foundation Symposium*. – 2004. – Vol. 259. – P. 208–217.
161. The coactivator role of histone deacetylase 3 in IL-1-signaling involves deacetylation of p65 NF- κ B / E. Ziesché, D. Kettner-Buhrow, A. Weber [et al.] // *Nucleic Acids Research*. – 2013. – Vol. 41. – № 1. – P. 90–109.
162. Histone deacetylase-3 activation promotes tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) expression in cardiomyocytes during lipopolysaccharide stimulation / H. Zhu, L. Shan, P. W. Schiller [et al.] // *The Journal of Biological Chemistry*. – 2010. – Vol. 285. – № 13. – P. 9429–9436.
163. Leus, N. G. Histone deacetylase 3 (HDAC 3) as emerging drug target in NF- κ B-mediated inflammation / N. G. Leus, M. R. Zwinderman, F. J. Dekker // *Current Opinion in Chemical Biology*. – 2016. – Vol. 33. – P. 160–168.
164. Ashburner, B. P. The p65 (RelA) subunit of NF-kappaB interacts with the histone deacetylase (HDAC) corepressors HDAC1 and HDAC2 to negatively regulate gene expression / B. P. Ashburner, S. D. Westerheide, A. S. Jr. Baldwin // *Molecular and Cellular Biology*. – 2001. – Vol. 21. – № 20. – P. 7065–7077.
165. HDAC5 modulates PD-L1 expression and cancer immunity via p65 deacetylation in pancreatic cancer / Y. Zhou, X. Jin, H. Yu [et al.] // *Theranostics*. – 2022. – Vol. 12. – № 5. – P. 2080–2094.

166. Sirt2 suppresses inflammatory responses in collagen-induced arthritis / J. Lin, B. Sun, C. Jiang [et al.] // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. – 2013. – Vol. 441. – № 4. – P. 897–903.
167. Regulation of SIRT1 and Its Roles in Inflammation / Y. Yang, Y. Liu, Y. Wang [et al.] // *Frontiers in Immunology*. – 2022. – Vol. 13. – P. 831168.
168. Interactions Between E2f1 and Sirt1 Regulate Apoptotic Response to DNA Damage / C. Wang, L. Chen, X. Hou [et al.] // *Nature Cell Biology*. – 2006. – Vol. 8. – № 9. – P. 1025–1031.
169. Yuan, J. A C-Myc-Sirt1 Feedback Loop Regulates Cell Growth and Transformation / J. Yuan, K. Minter-Dykhouse, Z. Lou // *The Journal of Cell Biology*. – 2009. – Vol. 185. – № 2. – P. 203–211.
170. Hypoxia increases sirtuin 1 expression in a hypoxia-inducible factor-dependent manner / R. Chen, E. M. Dioum, R. T. Hogg [et al.] // *The Journal of Biological Chemistry*. – 2011. – Vol. 286. – № 16. – P. 13869–13878.
171. Sirtuin 1 modulates cellular responses to hypoxia by deacetylating hypoxia-inducible factor 1alpha / J. H. Lim, Y. M. Lee, Y. S. Chun [et al.] // *Molecular Cell*. – 2010. – Vol. 38. – № 6. – P. 864–878.
172. Transcription factor NFκB regulates the expression of the histone deacetylase SIRT1 / J. Katto, N. Engel, W. Abbas [et al.] // *Clinical Epigenetics*. – 2013. – Vol. 5. – № 1. – P. 11.
173. Antagonistic crosstalk between NF-κB and SIRT1 in the regulation of inflammation and metabolic disorders / A. Kauppinen, T. Suuronen, J. Ojala [et al.] // *Cellular Signalling*. – 2013. – Vol. 25. – № 10. – P. 1939–1948.
174. Inhibition of Extracellular Calcium Influx Results in Enhanced IL-12 Production in LPS-Treated Murine Macrophages by Downregulation of the CaMKKβ-AMPK-SIRT1 Signaling Pathway / X. Liu, N. Wang, Y. Zhu [et al.] // *Mediators of Inflammation*. – 2016. – Vol. 2016. – P. 6152713.
175. Voelter-Mahlknecht, S. Cloning, chromosomal characterization and mapping of the NAD-dependent histone deacetylases gene sirtuin 1 / S. Voelter-Mahlknecht, U.

Mahlknecht // International Journal of Molecular Medicine. – 2006. – Vol. 17. – № 1. – P. 59–67.

176. Involvement of the p65/RelA subunit of NF-kappaB in TNF-alpha-induced SIRT1 expression in vascular smooth muscle cells / H. N. Zhang, L. Li, P. Gao [et al.] // Biochemical and Biophysical Research Communications. – 2010. – Vol. 397. – № 3. – P. 569–575.

177. Roles of SIRT1 in the acute and restorative phases following induction of inflammation / Z. Zhang, S. F. Lowry, L. Guarente [et al.] // The Journal of Biological Chemistry. – 2010. – Vol. 285. – № 53. – P. 41391–41401.

178. Zhou, Y. As a Modulator, Multitasking Roles of SIRT1 in Respiratory Diseases / Y. Zhou, F. Zhang, J. Ding // Immune Network. – 2022. – Vol. 22. – № 3. – P. e21.

179. SIRT1 Activation by Natural Phytochemicals: An Overview / C. Iside, M. Scafuro, A. Nebbioso [et al.] // Frontiers in Pharmacology. – 2020. – Vol. 11. – P. 1225.

180. Screening SIRT1 Activators from Medicinal Plants as Bioactive Compounds against Oxidative Damage in Mitochondrial Function / Y. Wang, X. Liang, Y. Chen [et al.] // Oxidative Medicine and Cellular Longevity. – 2016. – Vol. 2016. – P. 4206392.

181. Natural polyphenols as sirtuin 6 modulators / M. Rahnasto-Rilla, J. Tyni, M. Huovinen [et al.] // Scientific Reports. – 2018. – Vol. 8. – № 1. – P. 4163.

182. Resveratrol-like Compounds as SIRT1 Activators / L. Ciccone, E. Piragine, S. Brogi [et al.] // International Journal of Molecular Sciences. – 2022. – Vol. 23. – № 23. – P. 15105.

183. Hubbard, B. P. Small molecule SIRT1 activators for the treatment of aging and age-related diseases / B. P. Hubbard, D. A. Sinclair // Trends in Pharmacological Sciences. – 2014. – Vol. 35. – № 3. – P. 146–154.

184. Discovery of Potent Small-Molecule SIRT6 Activators: Structure-Activity Relationship and Anti-Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Activity / X. Chen, W. Sun, S. Huang [et al.] // Journal of Medicinal Chemistry. – 2020. – Vol. 63. – № 18. – P. 10474–10495.

185. D'Alessio, F. R. Mouse Models of Acute Lung Injury and ARDS / F. R. D'Alessio // Methods Mol. Biol. – 2018. – Vol. 1809. – P. 341–350.

186. Activation of pulmonary invariant NKT cells leads to exacerbation of acute lung injury caused by LPS through local production of IFN- γ and TNF- α by Gr-1⁺ monocytes / T. Aoyagi, N. Yamamoto, M. Hatta [et al.] // *Int. Immunol.* – 2011. – Vol. 23. – № 2 – P. 97–108.
187. Модель фатального острого поражения легких и острого респираторного дистресс-синдрома / И. А. Помыткин, В. Н. Каркищенко, Ю. В. Фокин [и др.] // *Биомедицина.* - 2020. - Т. 16. – № 4. - С. 24-33.
188. The relationship between SIRT1 and inflammation: a systematic review and meta-analysis / H. Sun, D. Li, C. Wei [et al.] // *Frontiers in Immunology.* – 2024. – Vol. 15. – P. 1465849.
189. Cao, Y. Elements of biological oscillations in time and space / Y. Cao, A. Lopatkin, L. You // *Nature Structural & Molecular Biology.* – 2016. – Vol. 23. – № 12. – P. 1030–1034.
190. Многоцентровое двойное слепое плацебо-контролируемое проспективное рандомизированное сравнительное исследование по изучению безопасности и эффективности применения препарата Лейтрагин, раствор для ингаляций, 1 мг/мл при лечении пациентов, госпитализированных с COVID-19 среднетяжелого течения. Фаза III: отчет о клиническом исследовании / Москва: ФГБУН НЦБМТ ФМБА России, 2022. – 300 с.
191. Mulchandani, R. Deciphering the COVID-19 cytokine storm: systematic review and meta-analysis / R. Mulchandani, T. Lyngdoh, A. K. Kakkar // *European Journal of Clinical Investigation.* – 2021. – Vol. 51. – № 1. – P. e13429.
192. Global prevalence of COVID-19-induced acute respiratory distress syndrome: systematic review and meta-analysis / A. W. Azagew, Z. W. Beko, Y. M. Ferede [et al.] // *Systematic Reviews.* – 2023. – Vol. 12. – № 1. – P. 212.
193. Biomarkers of cytokine storm as red flags for severe and fatal COVID-19 cases: a living systematic review and meta-analysis / A. K. G. Melo, K. M. Milby, A. L. M. A. Caparroz [et al.] // *PLoS One.* – 2021. – Vol. 16. – № 6. – P. e0253894.
194. Medzhitov, R. Origin and physiological roles of inflammation / R. Medzhitov // *Nature.* – 2008. – Vol. 454. – № 7203. – P. 428–435.

195. Medzhitov, R. Inflammation 2010: new adventures of an old flame / R. Medzhitov // *Cell*. – 2010. – Vol. 140. – № 6. – P. 771–776.
196. MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4 / R. Shimazu, S. Akashi, H. Ogata [et al.] // *The Journal of Experimental Medicine*. – 1999. – Vol. 189. – № 11. – P. 1777–1782.
197. Chinenov, Y. Nuclear receptors in inflammation control: repression by GR and beyond / Y. Chinenov, R. Gupte, I. Rogatsky // *Molecular and Cellular Endocrinology*. – 2013. – Vol. 380. – № 1-2. – P. 55–64.
198. The bidirectional interaction between NF- κ B and glucocorticoid receptor: underlying mechanisms of chronic stress-induced pathology / H. J. Yu, H. J. Park, B. Lee [et al.] // *Journal of Immunology Research*. – 2025. – Vol. 2025. – P. 5517840.
199. Efficacy of tocilizumab for hospitalized patients with COVID-19 pneumonia and high IL-6 levels: a randomized controlled trial / J. Sellarès-Nadal, J. Espinosa-Pereiro, J. Burgos [et al.] // *Infection*. – 2025. – Vol. 53. – № 5. – P. 1851–1861.
200. Non-steroidal anti-inflammatory drugs may worsen the course of community-acquired pneumonia: a cohort study / D. Basille, N. Plouvier, C. Trouve [et al.] // *Lung*. – 2017. – Vol. 195. – № 2. – P. 201–208.
201. Risks related to the use of non-steroidal anti-inflammatory drugs in community-acquired pneumonia in adult and pediatric patients / G. Voiriot, Q. Philippot, A. Elabbadi [et al.] // *Journal of Clinical Medicine*. – 2019. – Vol. 8. – № 6. – P. 786.
202. The use of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) in COVID-19 / P. Kushner, B. H. McCarberg, L. Grange [et al.] // *NPJ Primary Care Respiratory Medicine*. – 2022. – Vol. 32. – № 1. – P. 35.
203. Сравнительное изучение фармакокинетики пептидного препарата «Лейтрагин» в сыворотке крови и ткани лёгкого мышей линии C57BL/6Y после однократного ингаляционного введения / Н. С. Огнева, М. С. Нестеров, Д. В. Хвостов [и др.] // *Биомедицина*. - 2024. - Т. 20. – № 1. - С. 21-32.
204. Ингаляционное введение препарата Лейтрагин мышам линии C57BL/6Y в модели ОРДС повышает уровень экспрессии гена SIRT1 / Н. С. Огнева, Л. А. Таболякова, О. В. Алимкина [и др.] // *Биомедицина*. - 2023. - Т. 19. – № 3. - С. 36-41.

205. Лейтрагин повышает транскрипцию гена Сиртуин 6 в условиях острого воспаления легких у мышей / И. А. Помыткин, Н. С. Огнева, Н. В. Петрова [и др.] // Биомедицина. - 2025. - Т. 21. - № 1. - С. 8-17.
206. Эффекты гептапептида [D-Ala²]-Динорфин(1-7)Амида на транскрипцию сиртуинов в условиях острого воспаления в легких у мышей C57BL/6Y / И. А. Помыткин, Н. С. Огнева, Н. В. Петрова [и др.] // Биомедицина. - 2026. - Т. 22. – № 1. - С 15-24.
207. Эпигенетические механизмы противовоспалительного действия опиоидного пептида Лейтрагин: роль сиртуина 1 / И. А. Помыткин, Н. С. Огнева, Ю. В. Фокин [и др.] // Биомедицина. – 2024. – Т. 20. – № 3. – С. 10-20.
208. Биомоделирование острого воспаления легких и острого респираторного дистресс-синдрома на мышцах линии C57BL/6Y: эффект Лейтрагина на транскрипцию сиртуинов и провоспалительных цитокинов / Н. С. Огнева, Н. В. Петрова, М. С. Нестеров [и др.] // 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.
209. Мультитаргетное противовоспалительное действие опиоидного пептида Лейтрагин / Н. С. Огнева, М. С. Нестеров, Ю. В. Фокин [и др.] // Биомедицина. - 2026. - Т. 22. – № 1. - С. 10-14.

ПРИЛОЖЕНИЕ А



Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Научный центр биомедицинских технологий
 Федерального медико-биологического агентства

(ФГБУН НЦБМТ ФМБА России)

143442, Московская область, г.о Красногорск, пос. Светлые горы, вл.1;
 тел. (495) 561-5264, (495) 561-5273; ИНН 7709379649; www.scbmt.ru; e-mail: nibt@fmbamail.ru

УТВЕРЖДАЮ
 Директор
 доктор мед. наук, профессор
 В.Н. Каркищенко
 15 января 2026 г.

АКТ

о внедрении результатов диссертационной работы Огневой Настасьи Сергеевны
 «Исследование механизма противовоспалительного действия синтетических
 производных динорфина на модели острого воспаления легких» в разработку
 оригинального препарата Лейтрагин ФГБУН НЦБМТ ФМБА России для лечения
 COVID-19.

Мы, нижеподписавшиеся, подтверждаем, что следующие научные положения,
 результаты и выводы кандидатской диссертации Огневой Настасьи Сергеевны на тему
 «Исследование механизма противовоспалительного действия синтетических
 производных динорфина на модели острого воспаления легких» внедрены в разработку
 оригинального препарата Лейтрагин, раствор для ингаляций, действующее вещество
 тирозил-D-аланил-глицил-фенилаланил-лейцил-аргинина ацетат 1 мг/мл,
 регистрационное удостоверение №: ЛП-007043 (ФГБУН НЦБМТ ФМБА России):

1. Результаты исследования механизма антицитокинового действия синтетического
 производного динорфина 1-6 тирозил-D-аланил-глицил-фенилаланил-лейцил-аргинина
 ацетата на биомодели острого респираторного дистресс-синдрома на животных, как как
 часть регистрационного досье и обоснование механизма противовоспалительного
 действия лекарственного препарата Лейтрагин при COVID-19.

Зам. директора по научной работе
 ФГБУН НЦБМТ ФМБА России: к.м.н., доцент

М.Т. Гасанов

Зав. лабораторией № 4

Н.В. Петрова

