

УДК 615.038+ 615.21/.26



## ИЗУЧЕНИЕ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ НОВЫХ АГОНИСТОВ ГЕТЕРОРЕЦЕПТОРА EPOR/CD131 У ЖИВОТНЫХ С ЭНДОТЕЛИОСПЕЦИФИЧНОЙ ЭКСПРЕССИЕЙ МУТАНТНОГО ГЕНА POLG

М.В. Корокин<sup>1</sup>, М.В. Кубекина<sup>2</sup>, А.В. Дейкин<sup>1,2</sup>, О.В. Анциферов<sup>1</sup>, В.М. Покровский<sup>1</sup>, Л.В. Корокина<sup>1</sup>,  
Н.Л. Карташкина<sup>3</sup>, В.А. Солдатова<sup>1</sup>, Е.В. Кузубова<sup>1</sup>, А.И. Радченко<sup>1</sup>, М.В. Покровский<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования  
«Белгородский государственный национальный исследовательский университет»  
308015, Россия, г. Белгород, ул. Победы, 85

<sup>2</sup> Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биологии гена  
Российской академии наук  
119334, Россия, г. Москва, ул. Вавилова, 34/5

<sup>3</sup> Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования  
«Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова»  
(Сеченовский Университет)  
119991, Россия, г. Москва, ул. Трубецкая, 8/2

E-mail: mkorokin@mail.ru

Получено 05.05.2021

Принята к печати 15.08.2021

**Цель.** Изучение антиатеросклеротической и эндотелиопротективной активности пептидных производных, имитирующих а-спираль В эритропоэтина под лабораторными шифрами EP-11-1 (UEHLERALNSS), EP-11-2, (UEQLERALNCS), EP-11-3 (UEQLERALNTS).

**Материалы и методы.** Исследование проведено на 96 самцах мышей с генотипом Polg<sup>mut/mut</sup>/Cdh5-CRE на фоне C57Bl/6J. Атеросклероз моделировали путем баллонного повреждения сосудистой стенки у животных, находящихся на западной диете. Затем в течение 27 дней вводили изучаемые соединения 1 раз в 3 дня в дозе 20 мкг/кг. На 28-й день животных эвтаназировали и оценивали площадь атеросклеротических бляшек. Также в тканях аорты определяли экспрессию генов, связанных с процессами воспаления, апоптоза и ангиогенеза. Кроме того, было изучено эндотелиопротективное действие пептидов на изолированных кольцах грудной аорты диких и трансгенных мышей Polg<sup>mut/mut</sup>.

**Результаты.** При оценке размера бляшки у животных с генотипом Polg<sup>mut/mut</sup>/Cdh5-CRE на фоне применения изучаемых пептидов мы не обнаружили статистически значимого изменения размера бляшки. При проведении количественной полимеразной цепной реакции показано, что пептиды EP-11-1 и EP-11-2 статистически значимо в сравнении с контрольной группой животных, снижают экспрессию проапоптотических факторов p53 и Bax, а также увеличивают экспрессию антиапоптотического фактора Bcl-2. Введение соединения EP-11-1 и исходного пептида rHBSP привело к статистически значимому снижению соотношения Bax/Bcl-2). Соединения EP-11-1, EP-11-2 и EP-11-3 более эффективно, чем исходный пептид, rHBSP, снизили повышенную на фоне баллонной травмы экспрессию генов воспалительных маркеров iNOS, молекул межклеточной адгезии ICAM-1, VCAM-1 и E-селектина. Применение EP-11-1 привело к более эффективному, в сравнении с rHBSP, восстановлению эндотелийзависимой вазодилатации кольца аорты мышей с эндотелий специфической гиперэкспрессией мутантного гена Polg.

**Заключение.** В исследовании, проведенном на мышинной модели эндотелиоспецифичной экспрессии мутантной полимеразы гамма, нами показано, что производные пептида HBSP с лабораторными шифрами EP-11-1, EP-11-2, EP-11-3, полученные путем поиска групп родственных пептидов к молекуле rHBSP с помощью программы BLAST, обладают атеропротективной и эндотелиопротективной активностью, более выраженной в сравнении с исходным пептидом rHBSP.

**Ключевые слова:** атеросклероз; производные эритропоэтина; производные rHBSP, атеропротективное действие; эндотелиопротективное действие

**Для цитирования:** М.В. Корокин, М.В. Кубекина, А.В. Дейкин, О.В. Анциферов, В.М. Покровский, Л.В. Корокина, Н.Л. Карташкина, В.А. Солдатова, Е.В. Кузубова, А.И. Радченко, М.В. Покровский. Изучение фармакологической активности новых агонистов гетерорецептора Epor/CD131 у животных с эндотелиоспецифичной экспрессией мутантного гена Polg. *Фармация и фармакология*. 2021;9(4):294-305. DOI: 10.19163/2307-9266-2021-9-4-294-305

© М.В. Корокин, М.В. Кубекина, А.В. Дейкин, О.В. Анциферов, В.М. Покровский, Л.В. Корокина, Н.Л. Карташкина, В.А. Солдатова, Е.В. Кузубова, А.И. Радченко, М.В. Покровский, 2021

**For citation:** M.V. Korokin, M.V. Kubekina, A.V. Deikin, O.V. Antsiferov, V.M. Pokrovsky, L.V. Korokina, N.L. Kartashkina, V.A. Soldatova, E.V. Kuzubova, A.I. Radchenko, M.V. Pokrovsky. Study of the pharmacological activity of novel Epor/CD131 heteroreceptor agonists in mice with endothelial-specific expression of mutant Polg gene. *Pharmacy & Pharmacology*. 2021;9(4):294-305. DOI: 10.19163/2307-9266-2021-9-4-294-305

**Список сокращений:** ПЦР – полимеразная цепная реакция; pHBSP – pyroglutamate helix B surface peptide / пироглутаматный поверхностный пептид спирали B; HBSP – helix B surface peptide / поверхностный пептид спирали B; iNOS – индуцибельная NO-синтаза; Polg – polymerase gamma / полимеразы гамма; ICAM-1 – Inter-Cellular Adhesion Molecule 1 / межклеточная молекула адгезии – 1; VCAM-1 – Vascular cell adhesion molecule 1 / молекула адгезии клеточного эндотелия 1; ЭПО – эритропоэтин; EpoR – рецептор эритропоэтина; мРНК – матричная рибонуклеиновая кислота; HUVEC – Isolation of Human Umbilical Vein Endothelial Cells / культура эндотелиальных клеток из пупочной вены человека; AKT1 – RAC-alpha serine/threonine-protein kinase / RAC-альфа-серин/треонин-протеинкиназа; eNOS/NOS3 – эндотелиальная синтаза оксида азота; NO – оксид азота; АХ – ацетилхолин; PI3K – phosphoinositide 3-kinase / Фосфоинозитид-3-киназа; НП – нитропруссид натрия

## STUDY OF THE PHARMACOLOGICAL ACTIVITY OF NOVEL EPOR/CD131 HETERORECEPTOR AGONISTS IN MICE WITH ENDOTHELIAL-SPECIFIC EXPRESSION OF MUTANT POLG GENE

M.V. Korokin<sup>1</sup>, M.V. Kubekina<sup>2</sup>, A.V. Deikin<sup>1,2</sup>, O.V. Antsiferov<sup>1</sup>, V.M. Pokrovsky<sup>1</sup>, L.V. Korokina<sup>1</sup>, N.L. Kartashkina<sup>3</sup>, V.A. Soldatova<sup>1</sup>, E.V. Kuzubova<sup>1</sup>, A.I. Radchenko<sup>1</sup>, M.V. Pokrovsky<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Belgorod State National Research University

85, Pobeda Str., Belgorod, Russia, 308015

<sup>2</sup>Institute of Gene Biology, Russian Academy of Sciences

Bldg. 5, 34, Vavilov Str., Moscow, Russia, 119334

<sup>3</sup>First Moscow State Medical University named after I. M. Sechenov (Sechenov University)

Bldg. 2, 8, Trubetskaya str., Moscow, Russia, 119991

E-mail: mkorokin@mail.ru

Received 5 May 2021

Accepted 15 Aug 2021

**The aim** of the research was to study antiatherosclerotic and endothelial kinds of a protective activity of peptides mimicking an erythropoietin a-helix B tertiary structure with laboratory codes EP-11-1 (UEHLERALNSS), EP-11-2. (UEQLERALNCS), EP-11-3 (UEQLERALNTS).

**Materials and methods.** The study was conducted on 96 C57Bl/6J male double transgenic Polg<sup>mut/mut</sup>/Cdh5-CRE mice. Atherosclerosis was induced by a balloon injury accompanied by Western diet. Then, for 27 days, the drugs under study were administered once per 3 days at the dose of 20 µg/kg. On the 28<sup>th</sup> day, the animals were euthanized and the area of atherosclerotic plaques was collected for an assessment. The expression of genes associated with the processes of inflammation, apoptosis, and angiogenesis was determined in the tissues of the aorta. In addition, the endothelial protective effect of peptides in isolated segments of the thoracic aorta of wild and transgenic ransgenic Polg<sup>mut/mut</sup> mice was studied.

**Results.** The assessment of the plaque size in the animals with the Polg<sup>mut/mut</sup>/Cdh5-CRE genotype against the background of the peptides under study did not reveal statistically significant differences in comparison to control. However, a quantitative PCR showed a statistically significant decreased expression of pro-apoptotic factors p-53 and Bax, and also increase the expression of anti-apoptotic factor Bcl-2 against the background of the peptides EP-11-1 and EP-11-2 administration. The administration of EP-11-1 and the original peptide pHBSP resulted in a statistically significant decrease in the Bax/Bcl-2 ratio. Compounds EP-11-1, EP-11-2, and EP-11-3 were more effective than the original peptide pHBSP, in reducing the increased expression of genes for inflammatory markers iNos, intercellular adhesion molecules Icam-1, Vcam-1 and E-selectin. The use of EP-11-1 led to a more efficient, in comparison with pHBSP, restoration of endothelial-dependent vasodilation of the aortic segments in mice with endothelial-specific overexpression of the mutant Polg gene.

**Conclusion.** The study carried out on a murine model of the endothelial-specific expression of mutant gamma polymerase has shown that derivatives of the pHBSP peptide with laboratory codes EP-11-1, EP-11-2, EP-11-3, obtained by BLAST-searching for groups of pHBSP related peptides, have atheroprotective and endothelial protective kinds of a protective activity, which is more pronounced in comparison with the original peptide pHBSP.

**Keywords:** atherosclerosis; erythropoietin derivatives; pHBSP derivatives; atheroprotective effect; endothelial protective effect

**Abbreviations:** PCR – polymerase chain reaction; pHBSP – pyroglutamate helix B surface peptide; HBSP – helix B surface peptide; iNOS – inducible NO synthase; Polg – polymerase gamma; ICAM-1 – Inter-Cellular Adhesion Molecule 1; VCAM-1 – Vascular cell adhesion molecule-1; EPO – erythropoietin; EpoR – erythropoietin receptor; mRNA – matrix ribonucleic acid; HUVEC – Human Umbilical Vein Endothelial Cells; AKT1 – RAC-alpha serine/threonine-protein kinase ; eNOS / NOS3 – endothelial nitric oxide synthase; NO – nitrogen oxide; Ach – acetylcholine; PI3K – phosphoinositide 3-kinase; NP – sodium nitroprusside

## ВВЕДЕНИЕ

Эритропоэтин (ЭПО) – один из гормонов, вырабатываемых почками, первоначально идентифицированный в качестве критически важного регулятора процесса кроветворения. Рекомбинантный эритропоэтин широко используется при лечении анемии, связанной с хроническим заболеванием почек, сердечной недостаточностью и раком [1]. В организме человека эритропоэтин стимулирует производство около 200 миллиардов эритроцитов ежедневно. ЭПО, после выработки в почках, секретируется в кровотоки и его мишенью являются эритроидные клетки-предшественники, расположенные в костном мозге [2,3]. ЭПО действует путем связывания со своим специфическим рецептором на поверхности клеток-предшественников эритроцитов. Нокаут ЭПО (EPO<sup>-/-</sup>) или рецептора ЭПО (EpoR<sup>-/-</sup>) у мышей приводит к гибели эмбриона вследствие развития тяжелой анемии [4, 5].

За последнее десятилетие было выявлено множество не гемопоэтических эффектов эритропоэтина, включая его антиатеросклеротическое действие [6, 7]. При реализации негемопоэтических эффектов локально продуцируемый гипогликозилированный эритропоэтин действует паракринно-аутокринным путем и передает сигналы через взаимодействие с тканезащитным гетеродимерным рецептором эритропоэтина EpoR/CD131 [8, 9]. Доступность рекомбинантного эритропоэтина повлияла на появление работ, посвященных изучению негемопоэтической активности ЭПО, включая протективное действие на эндотелиоциты и нервные клетки. Сообщения о наличии рецепторов ЭПО (EpoR), экспрессии мРНК EpoR и/или белка EpoR за пределами органов эритропоэза предполагают возможность рецепторного негемопоэтического действия эритропоэтина [3]. Как сообщается в публикациях, эндотелиоциты из клеточной культуры HUVEC стали первыми клетками негемопоэтического ряда, которые экспрессируют рецепторы эритропоэтина, связывают эритропоэтин и показывают пролиферативный ответ на введение эритропоэтина *in vitro* [8, 10]. Было обнаружено, что ЭПО защищает культуры эндотелиальных клеток микрососудов головного мозга крыс от повреждения, вызванного аноксией, путем активации AKT1, поддержания потенциала митохондриальной мембраны, а также предотвращения процессов апоптоза, индуцированного оксидативным стрессом [12]. Важной функцией эндотелиальных клеток является экспрессия эндотелиальной синтазы оксида азота (eNOS/NOS3), которая участвует в синтезе оксида азота (NO) для регуляции сосудистого гомеостаза. С использованием клеточной культуры эндотелиоцитов было обнаружено, что сочетание пониженного содержания кислорода и добавления к клеточной культуре эритропоэтина увеличивает экспрессию мРНК и белка EpoR, увеличивает экспрессию eNOS и тем самым стимулирует продукцию оксида азота [13]. На экспериментальных моделях у трансгенных мышей, с высоким гематокритом, показано что артериальная гипертензия не развивается из-за значимого повышенного уровня eNOS и NO в сосудистой ткани и в кровотоке [14].

Сегодня очевидно, что протромботические побочные эффекты рекомбинантного эритропоэтина пре-

пятствуют его клиническому применению у пациентов, не страдающих анемией [15]. Для предотвращения тромботических осложнений, связанных с терапией ЭПО сегодня получены производные эритропоэтина, не обладающие гемопоэтической активностью, но обладающие тканепротективным действием. 11-аминокислотный пептид, имитирующий пространственную структуру цепи В эритропоэтина (HBSP) является одним из таких производных ЭПО, который проявляет не гемопоэтическую активность, сравнимую с рекомбинантным эритропоэтином [16–19].

Для поиска новых соединений, обладающих атеропротективным и эндотелиопротективным действием мы изменили аминокислотную последовательность HBSP путем поиска групп родственных пептидов исходного соединения с помощью программы BLAST. В результате получено 3 соединения, имитирующих  $\alpha$ -спираль В эритропоэтина: EP-11-1 (UEHLERALNSS), EP-11-2 (UEQLERALNCS), EP-11-3 (UEQLERALNTS).

**ЦЕЛЬ.** Изучение антиатеросклеротической и эндотелиопротективной активности соединений EP-11-1, EP-11-2, EP-11-3.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### Животные и диета

В исследование было включено 96 самцов мышей с генотипом Polg<sup>mut/mut</sup>/Cdh5-CRE на фоне C57Bl/6J, полученных из ФГБУН «Институт биологии гена» РАН. При работе соблюдались требования Закона РФ «О защите животных от жестокого обращения» от 24.06.1998 г., правил лабораторной практики при проведении доклинических исследований в РФ (ГОСТ 3 51000.3-96 и ГОСТ Р 53434-2009), директивы Европейского сообщества (86/609 EC), правил Международных рекомендаций Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых при экспериментальных исследованиях (1997 г.) и Правил лабораторной практики, принятых в Российской Федерации (приказ МЗ РФ № 708 от 29.08.2010 г.). Эксперименты были одобрены локальным этическим комитетом Белгородского государственного национального исследовательского университета, г. Белгород, протокол № 19/23 от 04.02.2020. Генотип Polg<sup>mut/mut</sup>/Cdh5-CRE ассоциирован эндотелиоспецифичной экспрессией мутантного гена Polg, кодирующего фермент полимераза гамма с мутацией D257A, приводящей к отсутствию 3'экзонуклеазной активности и накоплению мутаций при репликации генома митохондрий. Экспрессия мутантного белка приводит к развитию митохондриальной дисфункции с формированием нарушений процессов, протекающих в сосудистом эндотелии. За 2 недели до начала эксперимента животных помещали на западную диету с содержанием холестерина – 2% [20].

### Моделирование балонного повреждения сосудистой стенки

Операцию выполняли на подогреваемом столике под препаративным микроскопом с применением наркоза (золазепам 2,5 мг/100 г (Virbac, Франция) + ксилазин 2 мг/100 г (Биогель, Россия); введение про-

водили внутривенно) животным через хирургический доступ в медиальной области бедра выделяли общую бедренную артерию наносили баллонное повреждение эндотелия как это было описано ранее. Для облегчения послеоперационного болевого синдрома в течение 3-х дней с момента операции животные получали метамизол натрия с питьевой водой *ad libitum* в концентрации 50 мг метамизола натрия (Фармстандарт-Уфавита, Россия) на 100 мл воды [20–22].

#### Дизайн исследования и введение препаратов

Перечень исследуемых пептидов, их лабораторные шифры и аминокислотные последовательности представлены в таблице 1.

Животные с генотипом  $Polg^{mut/mut}/Cdh5-CRE$  были разделены на 6 равных групп:

- 1) Интактные;
- 2) Контроль – животные с моделированием баллонной травмы и получающие западную диету;
- 3) rHBSP – животные, с моделированием патологии, которым, начиная с 1-го дня, вводили пептид rHBSP в дозе 20 мкг/кг 1 раз в 3 дня течение 28-ми дней (суммарная доза 180 мкг/кг);
- 4) EP-11-1 – животные, с генотипом  $Polg^{mut/mut}/Cdh5-CRE$ , которым, начиная с 1-го дня, вводили пептид EP-11-1 в дозе 20 мкг/кг 1 раз в 3 дня в течение 28-ми дней (суммарная доза 180 мкг/кг);
- 5) EP-11-2 – животные, с генотипом  $Polg^{mut/mut}/Cdh5-CRE$ , которым, начиная с 1-го дня, вводили пептид EP-11-2 в дозе 20 мкг/кг 1 раз в 3 дня в течение 28-ми дней (суммарная доза 180 мкг/кг);
- 6) EP-11-3 – животные с генотипом  $Polg^{mut/mut}/Cdh5-CRE$ , которым, начиная с 1-го дня, вводили пептид EP-11-3 в дозе 20 мкг/кг 1 раз в 3 дня в течение 28-ми дней (суммарная доза 180 мкг/кг).

Доза и путь введения изучаемых пептидов выбраны с учетом экспериментальных данных, полученных нами ранее при исследовании фармакологической активности пула соединений, производных rHBSP, полученных путем добавления трипептидных мотивов RGD, KGD и PGP к исходному пептиду [20].

#### Измерение площади атеросклеротической бляшки

Макроскопическое изучение атеросклеротических бляшек аорты было выполнено с использованием материала от 4-х животных из каждой группы. Для этого на 28-й день после моделирования баллонной травмы животных эвтаназировали передозировкой наркоза (золетил 10 мг/100 г внутривенно) и аккуратно извлекали брюшную аорту от бифуркации до участка на уровне диафрагмы. Затем препараты продольно рассекали, расправляли на пенопластовой подложке, промывали 50%-ным раствором спирта этилового и погружали в раствор Oil Red O на 15 минут. После этого препараты промывали дистиллированной водой и делали цифровые фотоснимки. С применением программы *imageJ* на полученных снимках рассчитывали отношение площади атеросклеротической бляшки (окрашенной красным) к интактной ткани [20].

#### Количественная ПЦР

У остальных животных после эвтаназии ткань аорты в области нанесения баллонного повреждения забирали, гомогенизировали и инкубировали при 37°C в растворе «Extract RNA» в течении 10 минут. После лизирования образца в реагенте его подвергли хлороформной очистке, надосадочную пробу собирали и промывали изопропиловым спиртом и 70%-ным спиртом этиловым. Концентрацию полученной РНК измеряли на спектрофотометре IMPLEN NanoPhotometer® (IMPELEN, Германия) и доводили до концентрации 300 нг/мкл. Обратную транскрипцию проводили с использованием набора MMLVRTSK021 в соответствии с протоколом фирмы-производителя (Evrogen, Россия). Исследование проводили в соответствии с ранее описанной нами методикой [20]. В таблице 2 представлены праймеры, используемые при проведении количественной ПЦР.

#### Изучение влияния препаратов колец аорты на сосудистый эндотелий

Для проведения эксперимента были сформированы следующие экспериментальные группы (n=8 животных в группе):

- 1) Интактная группа – мыши с диким генотипом C57BL/6;
- 2) Контрольная группа Мыши с генотипом  $Polg^{mut/mut}/Cdh5-CRE$ ;
- 3) rHBSP –  $Polg^{mut/mut}/Cdh5-CRE$  + rHBSP 20 мкг/кг;
- 4) EP-11-1 –  $Polg^{mut/mut}/Cdh5-CRE$  + EP-11-1 20 мкг/кг;
- 5) EP-11-2 –  $Polg^{mut/mut}/Cdh5-CRE$  + EP-11-2 20 мкг/кг;
- 6) EP-11-3 –  $Polg^{mut/mut}/Cdh5-CRE$  + EP-11-3 20 мкг/кг.

Исследуемые соединения – инновационные пептиды с лабораторными шифрами EP-11-1, EP-11-2, EP-11-3 вводили внутривенно, в течение 7 дней в обозначенных дозах. На 8-й день от начала эксперимента животных наркотизировали с помощью внутривенного введения хлоралгидрата в дозе 300 мг/кг. Далее у анестезированных мышей была открыта грудная клетка для изъятия грудной аорты. Грудная аорта была помещена в модифицированный ледяной раствор Кребса Ханселейта (118 мМ NaCl, 4,7 мМ KCl, 1,2 мМ  $Na_2PO_4$ , 0,5 мМ  $MgCl_2$ , 1,12 мМ  $CaCl_2$ , 25 мМ  $NaHCO_3$ , 0,03 мМ ЭДТА) pH 7,4 с 11 мМ глюкозы. Аорту осторожно отделяли от окружающей жировой и соединительной ткани и разрезали на короткие поперечные сегменты размером 2 мм. Кольца аорты суспендировали в ванне для органов (Biopac Bas System Station, Biopac systems, США), содержащей 10 мл раствора КН, поддерживаемого при температуре 37°C, и барботировали 95%  $O_2$  и 5%  $CO_2$  между двумя параллельными крючками из нержавеющей стали. Изометрическое натяжение во время экспериментов измерялось и регистрировалось с помощью программно-аппаратного комплекса Biopac System, США. Регистрация и обработка данных производилась с помощью программного обеспечения Biopac Icq 4.2. Каждое кольцо аорты постепенно растягивали до исходного натяжения 0,8 г и давали уравновеситься в стандартной ванне для органов объемом 10 мл в течение 60 минут перед экспериментом. После уравновешивания кольца сначала контрактировали с помощью 60 мМ KCl, чтобы вызвать их сократительную реакцию и достигнуть воспроизводимый максималь-

ный сократительный ответ, затем их трижды промывали раствором Кребса Ханселейта, чтобы восстановить напряжение до базального уровня. Ответ сокращения колец аорты на субмаксимальную концентрацию фенилэфрина (1 мкмоль/л) индуцировали через 30 мин после восстановления базального уровня. На плато сокращения, вызванного эpineфрином, проводили пробы на эндотелийзависимую и эндотелинезависимую вазодилатацию. В качестве агента, вызывающего эндотелийзависимую вазодилатацию, в ванну с аортой кумулятивно добавляли ацетилхолин (АХ) ( $10^{-9}$ - $10^{-4}$  М), в качестве агента, вызывающего эндотелийнезависимую вазодилатацию – нитропруссид натрия (НП) ( $10^{-9}$ - $10^{-5}$  М). Чувствительность определяли как процент релаксации от исходного значения, полученного на плато введения эpineфрина.

### Статистическая обработка

Статистическая обработка выполнена с использованием программы Statistica 10.0. Полученные данные были проверены на нормальность распределения с использованием критерия Шапиро-Уилка и критерия Шпигельхальтера (библиотека normtest), оценку равенства дисперсий – с помощью критерия Левене (библиотека lawstat). В зависимости от типа распределения признаков и равенства дисперсий значимость полученных результатов оценивали с применением параметрического (ANOVA) или непараметрического (критерий Краскела-Уоллиса) однофакторного дисперсионного анализа, а в качестве post-hoc анализа для выявления различий при межгрупповых сравнениях использовали непарный *t*-критерий Стьюдента или критерий Манна-Уитни, соответственно, с поправкой Бенджамини-Хохберга на множественную проверку гипотез. Результаты считали достоверными при  $p \leq 0,05$ .

### РЕЗУЛЬТАТЫ

#### Макроскопическая оценка бляшки

В соответствии с дизайном эксперимента про-

ведена макроскопическая оценка бляшки, сформированной после балонной травмы у животных с диким генотипом (интактная группа) и у животных с генотипом Polg<sup>mut/mut</sup>/Cdh5-CRE (контрольная группа). Установлено, что в контрольной группе животных с генотипом Polg<sup>mut/mut</sup>/Cdh5-CRE во всех препаратах, окрашенных Oil Red O визуализировались липидные отложения, характерные для атеросклероза, что выразилось в увеличении размера бляшки в контрольной группе более чем в 11 раз. При проведении обработки данных, полученных при оценке размера бляшки у животных с генотипом Polg<sup>mut/mut</sup>/Cdh5-CRE на фоне применения изучаемых пептидов мы не обнаружили статистически значимого изменения размера бляшки (рис. 1).

### Количественная ПЦР

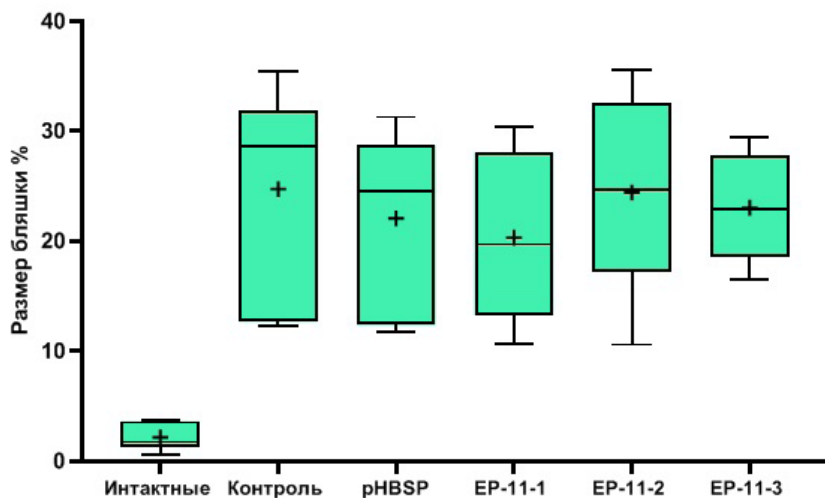
В дополнение к макроскопической оценке бляшки мы провели молекулярно-биологический анализ ткани атеросклеротической бляшки после балонного повреждения сосуда во всех экспериментальных группах. На рисунке 2 показано, что у животных с генотипом Polg<sup>mut/mut</sup>/Cdh5-CRE на фоне моделирования балонного повреждения существенно возрастает экспрессия маркеров программируемой клеточной гибели p53 и Bax и снижается экспрессия антиапоптотического маркера Bcl-2. Как видно из тепловой карты, представленной на рисунке 2А, пептиды EP-11-1 и EP-11-2 статистически значимо в сравнении с контрольной группой животных ( $p < 0,05$ ), снижают экспрессию проапоптотических факторов p53 и Bax, а также увеличивают экспрессию антиапоптотического фактора Bcl-2 ( $p < 0,05$ ). Наиболее эффективным в отношении изменения экспрессии факторов апоптоза оказалось соединение с лабораторным шифром EP-11-1 – значения экспрессии генов p53, Bax и Bcl-2 не отличались от таковых показателей в контрольной группе (рис. 2А).

Таблица 1 – Аминокислотная последовательность исследуемых соединений

Лабораторный шифр	Аминокислотная последовательность
pHBSP	QEQLERALNSS
EP-11-1	UEHLERALNSS
EP-11-2	UEQLERALNCS
EP-11-3	UEQLERALNTS

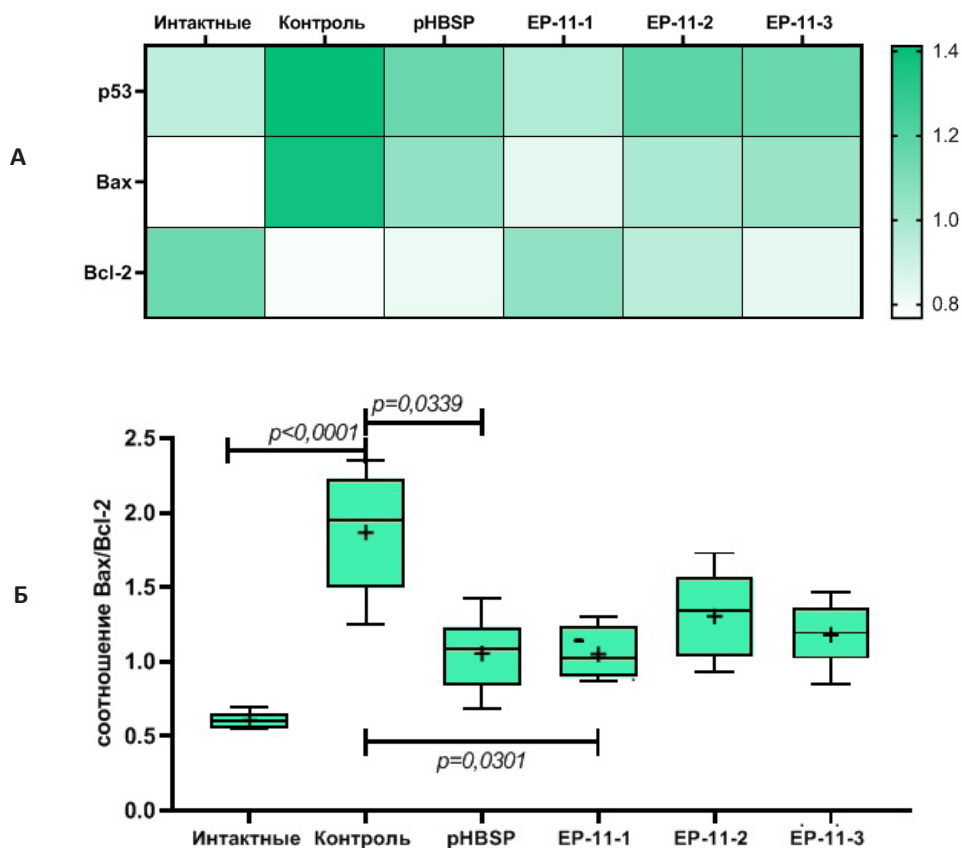
Таблица 2 – Праймеры, используемые для количественной ПЦР

Ген	F-праймер	R-праймер	Длина продукта	GenBank
Trp53 (p53)	CGACTACAGTTAGGGGGCAC	CCATGGCAGTCATCCAGTCT	95	NM_001127233.1
Bcl2	TCACCCCTGGTGGACAACAT	TTCCACAAAGGCATCCCAGC	102	NM_009741.5
Bax	CCCAGCTGATCAGAACCAT	GAGGCCTCCCAGCCAC	96	NM_007527.3
Vegfa (VEGF-A)	GGGCTCCGAAACCATGAA	TGCAGCCTGGGACCACTTG	95	NM_001025250.3
Flt-1 (VEGFR-1)	CCCATCGGCAGACCAATACA	CGGTGCAGTTGAGGACAAGA	96	NM_001363135.1
HIF-1a	AGAACAACCTTGAGCTGGCGT	TGGAGGTGAATAGGCTCTGT	103	NM_001092957.1
NOS2 (iNOS)	GCTCTAGTGAAGCAAAGCCCA	GGGATTCTGGAACATTCTGTGC	103	NM_001313921.1
ICAM-1	CTCCGGACTTTCGATCTTCCA	CCTTCCAGGGAGCAAACAAC	98	NM_010493.3
VCAM-1	TACTGTTTGAGCTCTCAAGC	CGTAGTGCTGCAAGTGAGGG	101	NM_011693.3
Sele (E-селектин)	GGGAAGAAGACTGTCCTAGCC	AGGGGAGCTGGCTTCTTAAG	96	XM_006496715.3
Gapdh	GGGTCCAGCTTAGGTTTCATC	CCCAATACGGCCAAATCCGT	100	NM_001289726.1



**Рисунок 1 – Размер атеросклеротической бляшки в группах животных с диким генотипом и с генотипом  $Polg^{mut/mut}/Cdh5-CRE$  на фоне применения изучаемых пептидов**

Примечание: знаком «+» на графике показано среднее арифметическое для каждой экспериментальной группы



**Рисунок 2 – Влияние исследуемых препаратов на относительную экспрессию маркеров апоптоза (2А) и соотношение Bax/Bcl-2 (2Б)**

Примечание: знаком + на графике показано среднее арифметическое для каждой экспериментальной группы

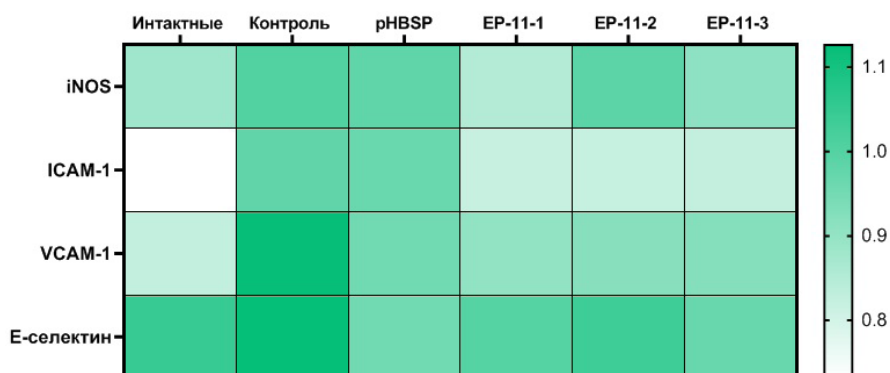


Рисунок 3 – Влияние исследуемых соединений на относительную экспрессию маркеров воспаления

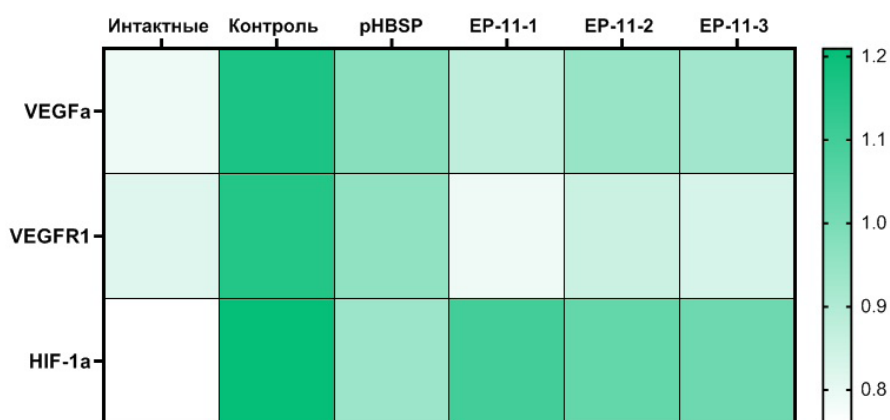


Рисунок 4 – Влияние исследуемых соединений на относительную экспрессию факторов, связанных с ангиогенезом

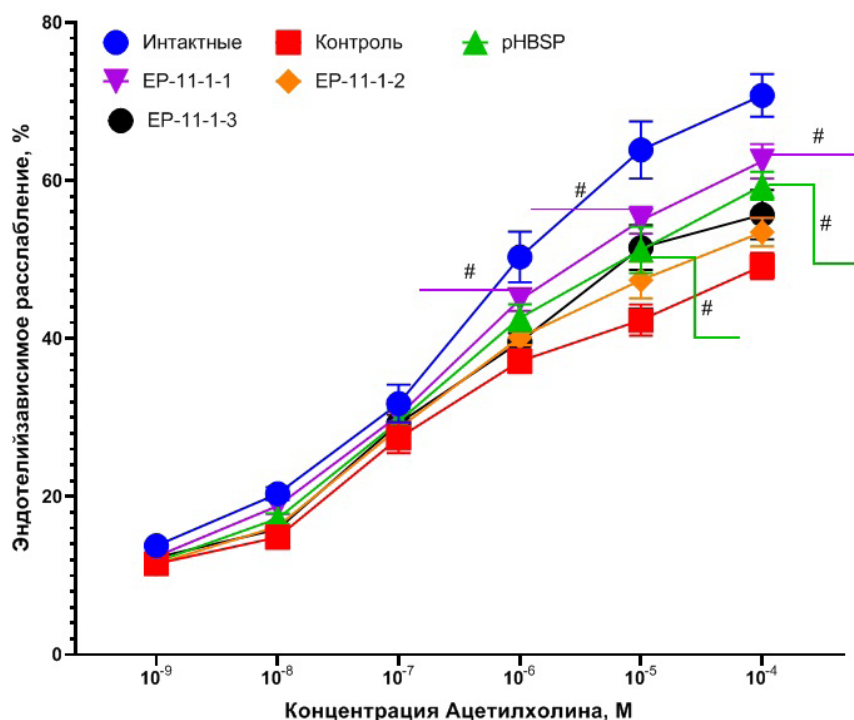


Рисунок 5 – Результаты проведения пробы с эндотелийзависимой вазодилатацией в ответ на ацетилхолин на изолированном кольце грудной аорты животных с генотипом Polg<sup>mut/mut</sup>/Cdh5-CRE  
Примечание: # – при p<0,05 в сравнении с контрольной группой животных (Polg-CRE)

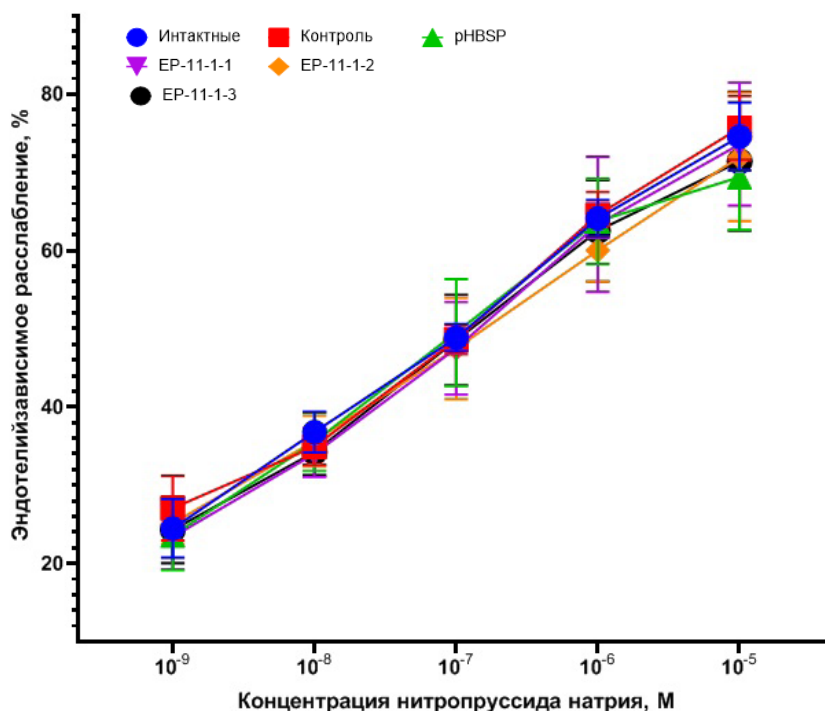


Рисунок 6 – Результаты проведения пробы с эндотелийнезависимой вазодилатацией в ответ на нитропруссид натрия на изолированном кольце грудной аорты животных с генотипом  $Polg^{mut/mut}/Cdh5-CRE$

На рисунке 2Б показано соотношение  $Vaх/Vcl-2$ , характеризующее интегральную проапоптотическую направленность клетки, чем оно выше, тем более выражена активация каскадов программируемой клеточной гибели. Из рисунка видно, что у животных с генотипом  $Polg^{mut/mut}/Cdh5-CRE$  соотношение  $Vaх/Vcl-2$  статистически значимо повышается, а введение соединения с лабораторным шифром EP-11-1 и исходного пептида pHBSP статистически значимо снижают соотношение  $Vaх/Vcl-2$  (рис. 2Б)

При изучении экспрессии группы воспалительных маркеров показано, что в контрольной группе животных с генотипом  $Polg^{mut/mut}/Cdh5-CRE$  статистически значимо повышается экспрессия iNOS, ICAM-1, VCAM-1 и E-селектина (рис. 3). Изучаемые соединения с лабораторными шифрами EP-11-1, EP-11-2 и EP-11-3, более эффективно, чем исходный пептид pHBSP, снизили повышенную на фоне баллонной травмы экспрессию генов воспалительных маркеров iNOS, молекул межклеточной адгезии ICAM-1, VCAM-1 и E-селектина. Наиболее выраженный эффект был получен в группе с применением соединения EP-11-1 (рис. 3).

Кроме того, исследуемые соединения с лабораторными шифрами EP-11-1, EP-11-2, EP-11-3 эффективнее, чем исходный пептид pHBSP, снизили экспрессию факторов, связанных с ангиогенезом (рис. 4). Наиболее эффективным в данном тесте, как и в большинстве ранее проанализированных данных, оказалось соединение с лабораторным шифром EP-11-1 (рис. 4).

### Оценка функционирования сосудистого эндотелия на препаратах изолированных колец аорты

Изучение влияния исследуемых соединений и исходного пептида pHBSP на функционирование сосудистого эндотелия проведено на изолированных сегментах грудной аорты мышей с генотипом  $Polg^{mut/mut}/Cdh5-CRE$ , получавших диету с высоким содержанием жиров. Эндотелиальную функцию оценивали путем проведения эндотелийзависимой вазодилатации в ответ на ацетилхолин (АХ). Как показано на рисунке 5 эндотелийзависимая вазодилатация, индуцированная ацетилхолином, была значительно снижена у мышей с генотипом  $Polg^{mut/mut}/Cdh5-CRE$  по сравнению с интактными мышами дикого типа.

Важно отметить, что нарушение эндотелийзависимой вазодилатации, вызванной АХ у мышей с эндотелийспецифической гиперэкспрессией мутантного гена  $Polg$ , было восстановлено введением пептида с лабораторным шифром EP-11-1 и степень релаксации кольца аорты в данной группе статистически значимо отличалась от данного показателя в контрольной группе животных с генотипом  $Polg^{mut/mut}/Cdh5-CRE$  при введении ацетилхолина в концентрациях  $10^{-6}M$ ,  $10^{-5}M$  и  $10^{-4}M$  (рис. 5). Введение исходного пептида pHBSP также привело к увеличению расслабления сосуда в ответ на введение ацетилхолина в концентрациях  $10^{-5}M$  и  $10^{-4}M$ . Введение пептидов с лабораторными шифрами другого соединения-лидера EP-11-2 и EP-11-3 статистически значимо не влия-



ло на степень ответа сегмента сосуда на ацетилхолин (рис. 5).

В тоже время, при анализе результатов эндотелийнезависимой вазодилатации в ответ на нитропруссид натрия статистически значимых различий между экспериментальными группами не обнаружено (рис. 6).

### ОБСУЖДЕНИЕ

Биологические эффекты рекомбинантного эритропоэтина широки и многогранны, и большое внимание исследователей привлекают его негематопоэтические эффекты, в частности нас заинтересовало атеропротективное и эндотелиопротективное действие. В исследованиях *in vivo* показано, что эритропоэтин уменьшает проявления ишемии и реперфузионного повреждения кардиомиоцитов, что частично объясняется увеличением выработки оксида азота и острым ответом на повышение гематокрита. В этом же исследовании сообщается, что эритропоэтин опосредованная активация eNOS связана с передачей сигналов PI3K, а связанное с ЭПО снижение проявлений ишемии кардиомиоцитов не наблюдается у мышей с генотипом eNOS  $-/-$  [23]. Предполагается, что эритропоэтин индуцированная продукция оксида азота эндотелиоцитами опосредуется, в первую очередь индукцией и активацией eNOS, особенно при пониженном содержании кислорода [24, 25]. Кроме того, у мышей с эктопической трансгенной экспрессией ЭПО обнаружена повышенная активность eNOS и повышенный уровень NO в плазме, что предотвращает сердечно-сосудистые заболевания, такие как гипертония и тромбоэмболия, а ингибирование NO-синтазы приводит к сердечно-сосудистой патологии и смерти [3].

Ввиду известного ограничения применения рекомбинантного эритропоэтина в эритропротективных дозах, проблема поиска новых производных эритропоэтина, обладающих его тканезащитными свойствами, но не стимулирующих кроветворение, является актуальной в современной медицине и фармакологии. Пептиды, являющиеся агонистами гетерорецептора EpoR/CD131 запускают каскады цитопротекции, ассоциированные эритропоэтином, но не оказывают эритропротективное действие. В ранее проведенных исследованиях продемонстрировано, что пептид, имитирующий пространственную структуру цепи В эритропоэтина rHBSP оказывает выраженное эндотелиопротективное действие при моделировании L-NAME-индуцированной эндотелиальной дисфункции у крыс [26, 27]. Однако, в этом исследовании нами также было показано протромботическое действие HBSP. С учетом вышесказанного, очевидна необходимость дальнейших модификаций данной молекулы. На наш взгляд, модификация HBSP для улучшения его фармакокинетических и фармакодинамических параметров может стать дальнейшим

многообещающим развитием фармакотерапии сердечно-сосудистых заболеваний на основе короткоцепочечных пептидов [28].

Поиск таких соединений может быть решен несколькими способами, включая присоединение аминокислотных мотивов с антикоагулянтными свойствами к аминокислотной последовательности или путем поиска групп родственных пептидов исходного соединения с помощью программы BLAST. На первом этапе исследования мы попробовали модернизировать исходную молекулу HBSP путем добавления трипептидных мотивов RGD, KGD и PGP, обладающих антиагрегантным действием. В результате были получены принципиально новые соединения, сочетающие в себе цитопротективный [29] и антиагрегантный эффекты [30]. Также нами показано, что используемые пептиды на основе эритропоэтина способны улучшать функциональное состояние сосудистой стенки на фоне атеросклеротического поражения и оказывают угнетающее влияние на патобиологические процессы, связанные с митохондриальной дисфункцией. Кроме того, исследуемые пептиды обладают выраженным эндотелиопротективным действием на фоне моделирования оксидативного стресса *in vitro* [20].

В данном исследовании мы изучили фармакологическую активность 3 пептидов, имитирующих а-спираль В эритропоэтина: EP-11-1 (UEHLERALNSS), EP-11-2 (UEQLERALNCS), EP-11-3 (UEQLERALNTS), полученных путем поиска групп родственных пептидов к молекуле rHBSP с помощью программы BLAST.

Для исследования нами выбрана линия животных, с эндотелиоспецифичной экспрессией мутантного гена Polg. Полимераза гамма – фермент, который играет ключевую роль в репликации митохондриальной ДНК. Патология данного фермента приводит к включению «неправильных» нуклеотидов без последующего исправления что вызывает митохондриальную дисфункцию с последующим увеличением выработки активных радикалов и повреждением клетки. Гомозиготные животные с системной мутацией Polg не выживают, поэтому в нашей работе мы использовали эндотелиоспецифичную экспрессию индуцируемого трансгена [20].

В используемой нами модели атеросклероз связан с травматическим воздействием на сосуд на фоне повреждения эндотелиоцитов вследствие дисфункции митохондрий. Проведенное исследование атеропротективной активности показало, что изучаемые пептиды, как и исходный пептид rHBSP, статистически значимо не влияют на гистологическое строение и размер атеросклеротической бляшки на выбранной модели патологии. Максимальное уменьшение размера атеросклеротической бляшки, установленное в группе животных, получавших EP-11-1, которое, однако, не носило статистически значимого характера. Возможно, в дальнейшем

следует изучить влияние полученных соединений лидеров на гистологическое строение и размер атеросклеротических бляшек на модели атерогенеза, не связанной с физическим повреждением эндотелия.

С использованием молекулярно-биологического анализа тканей сформированной атеросклеротической бляшки было обнаружено, что изучаемые пептиды EP-11-1 и EP-11-2 статистически значимо снижают экспрессию проапоптотических факторов p53 и Вах, а также увеличивают экспрессию антиапоптотического фактора Bcl-2. При расчете соотношения экспрессии Вах к Bcl-2 обнаружено что у животных с генотипом Polg<sup>mut/mut</sup>/Cdh5-CRE соотношение Вах/Bcl-2 статистически значимо повышается более чем в 3 раза, а введение соединения с лабораторным шифром EP-11-1 и исходного пептида рНВSP статистически значимо снижают соотношение Вах/Bcl-2 на 57,2 и 56,4% соответственно. Полученные данные согласуются с результатами других исследований, показывающих, что введение эритропоэтина в течение 10 недель заметно снижает соотношение белка Вах/Bcl-2 в аорте мышей с дефицитом аполипопротеина Е, получавших диету с высоким содержанием жиров [31]. Наряду с антиапоптотическим действием, изучаемые соединения с лабораторными шифрами EP-11-1, EP-11-2 и EP-11-3, более эффективно, чем исходный пептид рНВSP, снизили повышенную на фоне баллонной травмы экспрессию гена, кодирующего iNOS и снизили экспрессию генов и белков молекул межклеточной адгезии ICAM-1, VCAM-1 и E-селектина. При этом максимальная эффективность обнаружена в группе животных, получавших пептид с лабораторным шифром EP-11-1. Противовоспалительное действие эритропоэтина и его дериватов широко известно и изучено [32] и наше исследование подтвердило сохранение этого вида активности у дериватов, имитирующих цепь В эритропоэтина.

При проведении исследования фармакологической активности пептидов на изолированных сегментах легочной аорты в группе животных с генотипом Polg<sup>mut/mut</sup>/Cdh5-CRE обнаружено, что эндотелийзависимая вазодилатация, индуцированная ацетилхолином, была значительно снижена (70,8% при концентрации ацетихолина  $10^{-4}$  М) по сравнению с интактными мышами дикого типа (49,2% при концентрации ацетихолина  $10^{-4}$  М). Применение пептида EP-11-1 привело к восстановлению эндотелийзависимой вазодилатации, вызванной ацетилхолином в концентрациях  $10^{-6}$ М,  $10^{-5}$ М и  $10^{-4}$ М у мышей с

эндотелийспецифической гиперэкспрессией мутантного гена Polg. Введение исходного пептида рНВSP также привело к увеличению расслабления сосуда в ответ на введение ацетилхолина в концентрациях  $10^{-5}$ М и  $10^{-4}$ М. Введение пептидов с лабораторными шифрами другого соединения-лидера EP-11-2 и EP-11-3 статистически значимо не влияло на степень ответа сегмента сосуда на ацетилхолин. Обращает на себя внимание тот факт, что мы не обнаружили изменений в реакции эндотелийнезависимой вазодилатации ни в одной из экспериментальных групп. Указанный факт доказывает, что тканезащитный эффект изученных в настоящем исследовании пептидов включает нормализацию функции сосудистого эндотелия и обуславливает выраженную эндотелиопротективную активность соединений.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На первом этапе поиска новых производных эритропоэтина, обладающих тканезащитными свойствами без проявления гемопоэтической активности мы модернизировали исходный пептид HBSP путем добавления трипептидных мотивов RGD, KGD и PGP. Полученные соединения сочетали в себе цитопротективный и антиагрегантный эффекты, обладали эндотелиопротективной активностью и были способны защищать сосудистую стенку от атеросклеротического поражения. В настоящем исследовании мы проверили второй пул соединений – производных пептида HBSP с лабораторными шифрами EP-11-1 (UEHLERALNSS), EP-11-2. (UEQLERALNCS), EP-11-3 (UEQLERALNTS)., полученных путем поиска групп родственных пептидов к молекуле рНВSP с помощью программы BLAST. В исследовании, проведенном на мышинной модели эндотелийспецифичной экспрессии мутантного гена Polg нами показано, что наиболее активное соединение с лабораторным шифром EP-11-1 обладает более выраженной, чем исходный пептид рНВSP, атеропротективной и эндотелиопротективной активностью.

Результаты настоящего исследования, в совокупности с ранее полученными данными, характеризующими фармакологическую активность производных рНВSP, полученных путем добавления трипептидных мотивов RGD, KGD и PGP к исходной молекуле, доказывают эффективность и раскрывают перспективы дальнейшего использования рассматриваемых подходов к поиску новых пептидов – дериватов эритропоэтина, обладающих тканезащитными свойствами и не оказывающих гемопоэтического действия.

### ФИНАНСОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Исследование выполнено при поддержке гранта Президента РФ MD-757.2020.7 и гранта РФФИ проект №19-34-90073.

### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## АВТОРСКИЙ ВКЛАД

М.В. Корокин – создание идеи, планирование исследования, проведение исследования, статистическая обработка, написание статьи; М.В. Кубекина – подготовка экспериментальных животных, выделение РНК, конвертация РНК в кДНК, анализ экспрессии целевых генов; А.В. Дейкин – выделение РНК, конвертация РНК в кДНК, анализ экспрессии целевых генов; О.В. Анциферов – наблюдение и уход за животными, хендлинг животных, введение препаратов, исследование фармакологической активности; В.М. Покровский – наблюдение и уход за животными, хендлинг животных, введение препаратов, исследование фармакологической активности; Л.В. Корокина – статистическая обработка, разработка дизайна исследования; Н.Л. Карташкина – статистическая обработка, написание статьи, формализация списка литературы; Солдатов В.А. – наблюдение и уход за животными, хендлинг животных, введение препаратов, исследование фармакологической активности; Е.А. Кузубова – наблюдение и уход за животными, хендлинг животных, введение препаратов, исследование фармакологической активности; А.И. Радченко – наблюдение и уход за животными, хендлинг животных, введение препаратов, исследование фармакологической активности; М.В. Покровский – планирование исследования, консультация по вопросам проведения отдельных этапов экспериментальных работ, обеспечение качества.

## БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Jelkmann W. Erythropoietin after a century of research: younger than ever // *European Journal of Haematology*. – 2007. – Vol. 78, No.3. – P. 183–205. DOI: 10.1111/j.1600-0609.2007.00818.x.
2. Heikal L., Ghezzi P., Mengozzi M., Stelmaszczyk B., Feelisch M., Ferns G.A. Erythropoietin and a nonerythropoietic peptide analog promote aortic endothelial cell repair under hypoxic conditions: role of nitric oxide // *Hypoxia (Auckl)*. – 2016. – Vol. 16, No.4. – P. 121–133. DOI: 10.2147/HP.S104377.
3. Zhang Y., Wang L., Dey S., Alnaeeli M., Suresh S., Rogers H., Teng R., Noguchi C.T. Erythropoietin action in stress response, tissue maintenance and metabolism // *International journal of molecular sciences*. – 2014. – Vol. 15, No.6. – P. 10296–10333. DOI: 10.3390/ijms150610296.
4. Wu H., Liu X., Jaenisch R., Lodish H.F. Generation of committed erythroid BFU-E and CFU-E progenitors does not require erythropoietin or the erythropoietin receptor // *Cell*. – 1995. – No.83. – P. 59–67. DOI: 10.1016/0092-8674(95)90234-1.
5. Lin C.S., Lim S.K., D'Agati V., Costantini F. Differential effects of an erythropoietin receptor gene disruption on primitive and definitive erythropoiesis // *Genes & Development*. – 1996. – No.10. – P. 154–164. DOI: 10.1101/gad.10.2.154.
6. Ueba H., Shiomi M., Brines M., Yamin M., Kobayashi T., Ako J., Momomura S., Cerami A., Kawakami M. Suppression of coronary atherosclerosis by helix B surface Peptide, a nonerythropoietic, tissue-protective compound derived from erythropoietin // *Molecular medicine (Cambridge, Mass.)*. – 2013. – Vol. 19, No.1. – P. 195–202. DOI: 10.2119/molmed.2013.00037.
7. Lu K.Y., Ching L.C., Su K.H., Yu Y.B., Kou Y.R., Hsiao S.H., Huang Y.C., Chen C.Y., Cheng L.C., Pan C.C., Lee T.S. Erythropoietin suppresses the formation of macrophage foam cells: role of liver X receptor alpha // *Circulation*. – 2010. – Vol. 121, No.16. – P. 1828–1837. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.109.876839.
8. Haine L., Yegen C.H., Marchant D., Richalet J.P., Boncoeur E., Voituron N. Cytoprotective effects of erythropoietin: What about the lung? // *Biomedicine & Pharmacotherapy*. – 2021. – No.139. – P. 111547. DOI: 10.1016/j.biopha.2021.111547.
9. Brines M., Grasso G., Fiordaliso F., Sfacteria A., Ghezzi P., Fratelli M., Latini R., Xie Q.W., Smart J., Su-Rick C.J., Pobre E., Diaz D., Gomez D., Hand C., Coleman T., Cerami A. Erythropoietin mediates tissue protection through an erythropoietin and common beta-subunit heteroreceptor // *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. – 2004. – Vol. 101, No.41. – P. 14907–14912. DOI: 10.1073/pnas.0406491101.
10. Anagnostou A., Liu Z., Steiner M., Chin K., Lee E.S., Kessimian N., Noguchi C.T. Erythropoietin receptor mRNA expression in human endothelial cells // *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. – 1994. – No.91. – P. 3974–3978. DOI: 10.1073/pnas.91.9.3974.
11. Anagnostou A., Lee E.S., Kessimian N., Levinson R., Steiner M. Erythropoietin has a mitogenic and positive chemotactic effect on endothelial cells // *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. – 1990. – No.87. – P. 5978–5982. DOI: 10.1073/pnas.87.15.5978.
12. Hou J., Wang S., Shang Y.C., Chong Z.Z., Maiese K. Erythropoietin employs cell longevity pathways of SIRT1 to foster endothelial vascular integrity during oxidant stress // *Current Neurovascular Research*. – 2011. – No.8. – P. 220–235. DOI: 10.2174/156720211796558069.
13. Beleslin-Cokic B.B., Cokic V.P., Wang L., Pikhova B., Teng R., Schechter A.N., Noguchi C.T. Erythropoietin and hypoxia increase erythropoietin receptor and nitric oxide levels in lung microvascular endothelial cells // *Cytokine*. – 2011. – No.54. – P. 129–135. DOI: 10.1016/j.cyto.2011.01.015.
14. Kanagy N.L., Perrine M.F., Cheung D.K., Walker B.R. Erythropoietin administration *in vivo* increases vascular nitric oxide synthase expression // *Journal of Cardiovascular Pharmacology*. – 2003. – No.42. – P. 527–533. DOI: 10.1097/00005344-200310000-00011.
15. Corwin H.L., Gettinger A., Fabian T.C., May A., Pearl R.G., Heard S., An R., Bowers P.J., Burton P., Klausner M.A., Corwin M.J. Efficacy and safety of epoetin alfa in critically ill patients // *The New England Journal of Medicine*. – 2007. – No.357. – P. 965–976. DOI: 10.1056/NEJMoa071533.
16. Brines M., Patel N.S., Villa P., Brines C., Mennini T., De Paola M., Erbayraktar Z., Erbayraktar S., Sepodes B., Thiemermann C., Ghezzi P., Yamin M., Hand C.C., Xie Q.W., Coleman T., Cerami A. Nonerythropoietic, tissue-protective peptides derived from the tertiary structure of erythropoietin // *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. – 2008. – No.105. – P. 10925–10930. DOI: 10.1073/pnas.0805594105.
17. Erbayraktar Z., Erbayraktar S., Yilmaz O., Cerami A., Coleman T., Brines M. Nonerythropoietic tissue protective compounds are highly effective facilitators of wound healing // *Molecular Medicine*. – 2009. – No.15. – P. 235–241. DOI: 10.2119/molmed.2009.00051.
18. Ueba H., Brines M., Yamin M., Umemoto T., Ako J., Momomura S., Cerami A., Kawakami M. Cardioprotection by a nonerythropoietic, tissue-protective peptide mimicking the 3D structure of erythropoietin // *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. – 2010. – No.107. – P. 14357–14362. DOI: 10.1073/pnas.1003019107.
19. Ahmet I., Tae H.J., Juhaszova M., Riordon D.R., Boheler K.R., Sollott S.J., Brines M., Cerami A., Lakatta E.G., Talan M.I. A small nonerythropoietic helix B surface peptide based upon erythropoietin structure is cardioprotective against ischemic myocardial damage // *Molecular Medicine*. – 2011. – Vol. 17, No.3–4. – P. 194–200. DOI: 10.2119/molmed.2010.00235.
20. Пученкова О.А., Надеждин С.В., Солдатов В.О., Жученко М.А., Коршунова Д.С., Кубекина М.В., Коршунов Е.Н., Корокина Л.В., Куликов А.Л., Голубинская П.А., Покровский В.М., Патраханов Е.А., Лебедев П.Р., Гуреев

- В.В., Денисюк Т.А., Беляева В.С., Мовчан Е.А., Лепетюха Е.И., Покровский М.В. Изучение антиатеросклеротической и эндотелиопротективной активности пептидных агонистов гетерорецептора EPO/CD131 // Фармация и фармакология. – 2020. – Т. 8, № 2 – С. 100–111. DOI: 10.19163/2307-9266-2020-8-2-100-111.
21. Stubbendorff M., Hua X., Deuse T.I. Inducing myointimal hyperplasia versus atherosclerosis in mice: an introduction of two valid models // Journal of Visualized Experiments. – 2014. – No.87. – P. 51459. DOI: 10.3791/51459.
  22. Tediashvili G., Wang D., Reichenspurner H., Deuse T., Schrepfer S. Balloon-based injury to induce Myointimal Hyperplasia in the Mouse Abdominal Aorta // Journal of Visualized Experiments. – 2018. – No. 132. – P. 56477. DOI: 10.3791/56477.
  23. Teng R., Calvert J.W., Sibmooh N., Piknova B., Suzuki N., Sun J., Martinez K., Yamamoto M., Schechter A.N., Lefler D.J., Noguchi C.T. Acute erythropoietin cardioprotection is mediated by endothelial response. Basic Res. Cardiol. – 2011. – No.106. – P. 343–354. DOI: 10.1007/s00395-011-0158-z.
  24. Yasuda H., Iwata Y., Nakajima S., Furuichi K., Miyake T., Sakai N., Kitajima S., Toyama T., Shinozaki Y., Sagara A., Miyagawa T., Hara A., Shimizu M., Kamikawa Y., Sato K., Oshima M., Yoneda-Nakagawa S., Kaneko S., Wada T. Erythropoietin signal protected human umbilical vein endothelial cells from high glucose-induced injury // Nephrology (Carlton). – 2019. – Vol. 24, No. 7. – P. 767–774. DOI: 10.1111/nep.13518.
  25. Belesin-Cokic B.B., Cokic V.P., Yu X., Weksler B.B., Schechter A.N., Noguchi C.T. Erythropoietin and hypoxia stimulate erythropoietin receptor and nitric oxide production by endothelial cells // Blood. – 2004. – No.104. – P. 2073–2080. DOI: 10.1182/blood-2004-02-0744.
  26. Корокин М.В., Солдатов В.О., Титце А., Голубев И.В., Белых А.Е., Кубекина М.В., Пученкова О.А., Денисюк Т.А., Гуреев В.В., Покровская Т.Г., Гудырев О.С., Жученко М.А., Затолокина М.А., Покровский М.В. 11-аминокислотный пептид, имитирующий структуру α-спирали в эритропоэтина, улучшает функцию эндотелия, но стимулирует тромбообразование у крыс // Фармация и фармакология. – 2019. – Т. 7, № 6. – С. 312–320. DOI: 10.19163/2307-9266-2019-7-6-312-320.
  27. Shokrzadeh M, Etebari M, Ghassemi-Barghi N. An engineered non-erythropoietic erythropoietin-derived peptide, ARA290, attenuates doxorubicin induced genotoxicity and oxidative stress // Toxicology in Vitro. – 2020. – No.66. – P. 104864. DOI: 10.1016/j.tiv.2020.104864.
  28. Belyaeva V.S., Stepenko Yu.V., Lyubimov I.I., Kulikov A.L., Tietze A.A., Kochkarova I.S., Martynova O.V., Pokopeyko O.N., Krupen'kina L.A., Nagikh A.S., Pokrovskiy V.M., Patrakhanov E.A., Belashova A.V., Lebedev P.R., Gureeva A.V. Non-hematopoietic erythropoietin-derived peptides for atheroprotection and treatment of cardiovascular diseases // Research Results in Pharmacology. – 2020. – Vol. 6, No.3. – P. 75–86. DOI: 10.3897/rrpharmacology.6.58891.
  29. Golubev I.V., Gureev V.V., Korokin M.V., Zatolokina M.A., Avdeeva E.V., Gureeva A.V., Rozhkov I.S., Serdyuk EA, Soldatova VA. Preclinical study of innovative peptides mimicking the tertiary structure of the α-helix B of erythropoietin // Research Results in Pharmacology. – 2020. – Vol. 6, No. 2. – P. 85–96. DOI: 10.3897/rrpharmacology.6.55385).
  30. Golubev I.V., Gureev V.V., Korokina L.V., Gudyrev O.S., Pokrovskaia T.G., Pokopeiko O.N., Pokrovskii V.M., Artyushkova E.B., Korokin M.V. The anti-aggregation activity of new 11-amino acid of erythropoietin derivate containing tripeptide motifs // Archivos venezolanos de farmacología y terapéutica. – 2020. – Vol. 39, No.5. – P. 588–591. DOI: 10.5281/zenodo.4264989.
  31. Warren J.S., Zhao Y., Yung R., Desai A. Recombinant human erythropoietin suppresses endothelial cell apoptosis and reduces the ratio of Bax to Bcl-2 proteins in the aortas of apolipoprotein E-deficient mice // Journal of Cardiovascular Pharmacology. – 2011. – Vol. 57, No. 4. – P. 424–33. DOI: 10.1097/FJC.0b013e31820d92fd.
  32. Nairz M, Sonnweber T, Schroll A, Theurl I, Weiss G. The pleiotropic effects of erythropoietin in infection and inflammation // Microbes and Infection. – 2012. – Vol. 14, No. 3. – P. 238–246. DOI: 10.1016/j.micinf.2011.10.005.

## АВТОРЫ

**Корокин Михаил Викторович** – доктор медицинских наук, доцент, руководитель лаборатории НИИ Фармакологии живых систем НИУ «БелГУ». ORCID ID: 0000-0001-5402-0697. E-mail: mkorokin@mail.ru

**Кубекина Марина Владиславовна** – аспирант, младший научный сотрудник Института биологии гена РАН. ORCID ID: 0000-0002-8834-1111. E-mail: kubekina@genebiology.ru

**Дейкин Алексей Васильевич** – кандидат биологических наук, руководитель объединенного центра генетических технологий НИУ «БелГУ», руководитель ЦКП «Геномное редактирование» ИБГ РАН. ORCID ID: 0000-0001-9960-0863. E-mail: alexei@deikin.ru

**Анциферов Олег Владимирович** – старший преподаватель кафедры факультетской терапии НИУ «БелГУ». ORCID ID: 0000-0001-6439-2419. E-mail: antsiferov@bsu.edu.ru

**Покровский Владимир Михайлович** – студент 6 курса, Медицинский институт НИУ «БелГУ». ORCID ID: 0000-0003-3138-2075. E-mail: vmpokrovsky@yandex.ru

**Корокина Лилия Викторовна** – кандидат медицинских наук, доцент, доцент кафедры фармакологии и клинической фармакологии НИУ «БелГУ». ORCID ID: 0000-0002-4115-1564. E-mail: korokina@mail.ru

**Карташкина Наталия Левоновна** – кандидат медицинских наук, доцент кафедры гистологии, цитологии и эмбриологии, ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова МЗ РФ (Сеченовский университет). ORCID ID: 0000-0003-4648-9027. E-mail: kartashkuna\_n\_l@staff.sechenov.ru

**Солдатова Валерия Андреевна** – аспирант кафедры фармакологии и клинической НИУ «БелГУ». ORCID ID: 0000-0001-6637-1654. E-mail: lorszoldatova@gmail.com

**Кузубова Елена Валерьевна** – аспирант кафедры фармакологии и клинической фармакологии НИУ «БелГУ». ORCID ID: 0000-0003-2425-5027. E-mail: 1015artek1015@mail.ru

**Радченко Александра Игоревна** – аспирант кафедры фармакологии и клинической фармакологии НИУ «БелГУ». ORCID ID: 0000-0002-4554-2116. E-mail: sandrinkaradchenko@gmail.com

**Покровский Михаил Владимирович** – доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой фармакологии и клинической фармакологии НИУ «БелГУ». ORCID ID: 0000-0002-1493-3376. E-mail: pokrovskii@bsu.edu.ru