

УДК: 616-092.9: 616-008: 615.324: 612.76

# Поиск оптимального профиля масс нейропептидов для реализации антигипоксического и активирующего действия

© 2020. Е.Б.Шустов<sup>1,2</sup>, Д.Ю. Ивкин<sup>1\*</sup>, А.С. Ивкина<sup>1</sup>, А.Е. Ким<sup>3</sup>, С.Л. Люблинский<sup>4</sup>, М.С. Нестеров<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет  
Министерства здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург, Россия

<sup>2</sup> Институт токсикологии Федерального медико-биологического агентства России, Санкт-Петербург, Россия

<sup>3</sup> Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова Министерства обороны  
Российской Федерации, Санкт-Петербург, Россия

<sup>4</sup> Научный центр биомедицинских технологий Федерального  
медико-биологического агентства России, Санкт-Петербург, Россия

\* e-mail: dmitry.ivkin@pharminnotech.com

Поступила в редакцию 03.12.2020 г.

После доработки 23.12.2020 г.

Принята к публикации 24.12.2020 г.

В данном исследовании на лабораторных крысах изучалась зависимость проявления фармакологических эффектов нейротропных пептидов природного и синтетического происхождения от их структуры. Сначала проводилось исследование относительных молекулярных профилей пептидных комплексов с помощью ВЭЖК (гельпроникающая хроматография) с внутренним стандартом. Затем пептидные комплексы вводились животным ректально и проверялась их биологическая активность на двух независимых моделях: антигипоксической активности (методика барокамерного подъема с определением времени жизни животных на критической высоте) и оценки физической работоспособности (время вынужденного плавания до отказа животных с грузом 10% от массы тела). Полученные данные о биологической активности (ее повышении) сопоставляли с особенностями структуры пептидов. Для оценки влияния дозы препаратов на их активность был выполнен однофакторный дисперсионный анализ.

Было показано, что антигипоксическая активность и стимулирование работоспособности в той или иной степени присущи всем исследуемым пептидным препаратам, являются дозозависимыми и связанными с особенностями молекулярно-массового распределения пептидных компонентов. Также установлено, что специфическая антигипоксическая активность пептидных препаратов из тканей мозга связана с компонентами, имеющими диапазон масс от 5 до 10 кДа. Определены оптимальные для реализации биологической активности соотношения долей пептидных компонентов по диапазонам масс.

Кроме того, хроматографические характеристики (молекулярно-массовое распределение по диапазонам масс) природных нейропептидных комплексов могут быть использованы для прогнозирования выраженности их биологических эффектов.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** нейропептиды; хроматография; статистическое моделирование; антигипоксическая активность; работоспособность; лабораторные животные

DOI: 10.17816/phf52964/2713-153X-2020-4-2-72-81

## СОКРАЩЕНИЯ:

ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография;

ВПП – время первого падения;

ВЖ – время жизни на высоте;

ВВП – время восстановления позы;

СО – стандартный образец;

ППК – полипептидный природный комплекс;

ВП – время плавания с грузом.

## ВВЕДЕНИЕ

Одной из активно развивающихся групп лекарственных средств являются нейротропные пептиды природного и синтетического происхождения («Церебролизин», «Кортексин», «Эпиталамин», «Семакс», «Селанк», «Рифотируин», «Ноопепт» и их аналоги). Многочисленные исследования последних десятилетий показали, что к числу их типичных фармакологических эффектов относятся антигипоксическое действие, как проявление универсального нейропротекторного эффекта, и способность повышать физическую работоспособность, как проявление активирующего эффекта препаратов [1–6].

В то же время в литературе практически отсутствуют данные, характеризующие особенности строения пептидных препаратов и их фармакологического действия. Если для синтетических нейропептидов эта задача мало отличается от обычно стоящих перед фармакологами задач исследования «структура – эффект», то для природных нейропептидных препаратов, представляющих собой комплекс из нескольких пептидных фракций, зачастую не установленного строения, подобная задача может вообще не иметь решения до расшифровки первичной структуры всех компонентов и изучения их свойств по отдельности.

Нам представляется, что изучение относительных массовых профилей нейропептидов, получаемых при современных хроматографических исследованиях (например, гелепроникающая ВЭЖХ) при сопоставлении с результатами оценки влияния препаратов их комбинаций на устойчивость к гипоксии и физическую работоспособность животных, позволит приблизиться к пониманию закономерностей формирования эффектов действия нейропептидов.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе исследовались выпускаемые фармацевтической промышленностью готовые лекарственные формы препаратов «Семакс» (производитель ИМГ РАН, Россия), «Кортексин» (производитель «Герофарм», Россия) и «Даларгин» (производитель «Бион», Россия), а также экспериментальные полипептидные комплексы, полученные по оригинальной технологии методом ферментативного гидролиза из тканей определенных участков мозга телят.

Биологическая активность изучаемых пептидов проверялась на двух независимых моделях: антигипоксической активности (методика барокамерного подъема с определением времени жизни животных на критической высоте) и оценки физической работоспособности (время вынужденного плавания до отказа животных с грузом 10% от массы тела).

Одной из методических проблем становится формирование объединенного аналитического массива данных, так как исследования активности отдельных препаратов и их комбинаций, осуществляемые даже в одной организации, проводятся в разное время, на разных по количественным характеристикам группах животных и зачастую из-за большой разницы между данными контрольных групп не могут быть объединены в единый массив.

Методически корректное объединение данных в единый аналитический массив может быть достигнуто статистической технологией популяционного переноса. Эта технология основана на статистических свойствах нормированного Z-распределения, позволяющего оценить место конкретного наблюдения в популяционной выборке, соответствующей нормальному статистическому распределению частот встречаемости случайной величины. Для этого необходимо получить Z-оценки наблюдений (или соответствующие им T-балльные значения наблюдений):

$$Z(X_i) = \frac{X_i - X_m}{\sigma},$$

где

$X_i$  – конкретное наблюдение (его значение);

$X_m$  – среднее значение в соответствующей контрольной группе наблюдений;

$\sigma$  – стандартное отклонение по выборке соответствующей контрольной группы.

T-баллы оценки наблюдения  $X_i$  определяются по следующей формуле:

$$T = 50 + 10 \times Z(X_i).$$

В соответствии со свойствами Z-распределения, оно имеет нормальный характер с максимумом в области 0 и стандартным отклонением равным 1. Соответственно, T-распределение также носит нормальный характер с максимумом в области 50 и стандартным отклонением, равным 10. И Z-оценки, и T-оценки разных наблюдений могут объединяться в единый массив, также проявляющий свойства статистически нормального распределения, что позволяет использовать этот прием для решения задач популяционного переноса результатов экспериментальных исследований [6]. Для удобства интерпретации мы использовали T-оценки экспериментальных данных.

### Животные

Для исследования были использованы беспородные белые крысы, полученные из питомника «Рапполово». Исследования антигипоксической активности проводились на крысах-самцах 3-месячного возраста массой  $250 \pm 20$  г. Исследования по работоспособности выполнялись на крысах-самцах массой  $200 \pm 20$  г, предварительно обученных к плаванию с грузом.

В наших исследованиях мы придерживались требований, утвержденных:

1. Национальным стандартом Российской Федерации ГОСТ Р-53434-2009 «Принципы надлежащей лабораторной практики»;

2. Приказом Министерства здравоохранения РФ от 01.04.2016 г. №199н «Об утверждении Правил лабораторной практики»;

3. Руководством по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ (2-изд., перераб. и доп. – Москва: ОАО «Издательство «Медицина», 2005. – 832 с.).

Применялись также стандартные операционные процедуры Санкт-Петербургского государственного химико-фармацевтического университета Министерства здравоохранения РФ.

Длительность карантина (акклиматизационного периода) для всех животных составляла 14 дней. В течение карантина проводили ежедневный осмотр каждой крысы (поведение и общее состояние). Дважды в день животных наблюдали в клетках (заболеваемость и смертность). Перед началом исследования крысы, отвечающие критериям включения в эксперимент, были распределены на группы с помощью метода рандомизации. Животные, не соответствующие критериям, были исключены из исследования в течение карантина.

Крысы содержались в вентилируемых клетках группами по три в клетке. В качестве подстилки использовали стерильные древесные опилки из хвойных пород деревьев. В качестве корма – стандартный комбикорм гранулированный полнорационный для лабораторных животных (экструдированный) ПК-120 ГОСТ Р 51849-2001 Р.5. Кормление осуществлялось по нормативам в соответствии с видом животных. Водопрово-

дная очищенная вода всем крысам давалась *ad libitum* в стандартных поилках. Животные содержались в контролируемых условиях окружающей среды: температура воздуха 18–22 °С, относительная влажность 60–70%. Освещение в помещениях – естественно-искусственное, с 12-часовым циклом.

#### Методики исследования

Оценку влияния препаратов на индивидуальную устойчивость к гипоксии проводили в приточно-вытяжной барокамере при скорости «подъема» животных, равной 165 м/с, до критической высоты (11500 м), на площадке которой животные находились до агонального состояния, с последующим восстановлением (с прежней скоростью) нормального барометрического давления и, соответственно, парциального давления кислорода во вдыхаемом воздухе.

В ходе исследования регистрировались следующие показатели:

ВПП – время первого падения (переход в лежачее положение), характеризующее порог реакции организма на данное воздействие, с;

ВЖ – время жизни на высоте (появление агонального дыхания), характеризующее порог переносимости воздействия, с;

ВВП – время восстановления позы, характеризующее стойкость и тяжесть сформировавшегося у животного критического гипоксического состояния, с.

Основным анализируемым показателем являлось время жизни животного на критической высоте [7, 8].

Тест вынужденного плавания представляет собой комбинированный жесткий вид стресса, сочетающий физический и эмоциональный компоненты. Для проведения теста лабораторным животным в области основания хвоста прикрепляется груз, пропорциональный весу животного [9–11].

В зависимости от того, какой режим физических нагрузок (низкий, умеренный, средней интенсивности, высокой интенсивности) планируется к изучению, выбирается соответствующая масса груза:

– 2,5–3% от массы тела – низкий уровень нагрузок большой длительности;

– 5% – умеренный уровень нагрузок средней длительности;

– 7,5% – средний уровень интенсивности нагрузок;

– 10% – высокий уровень нагрузок, выполнение которых возможно только короткое время.

Тест предельного плавания с грузом 2,5–3% обычно используется для оценки аэробного порога работы животных, более 10% – анаэробного порога, 7,5–10% – для изучения смешанной (аэробно-анаэробной) физической работоспособности. Груз 10% от массы тела обычно используется также при тестировании препаратов в интересах спорта высших достижений. В нашей работе тестирование работоспособности осуществляли с грузом 10%.

Экспериментальные животные были рандомизированы на равноценные группы по десять особей, по две группы на каждый исследуемый пептидный препарат (одна – для исследования физической работоспособности, вторая – для исследования устойчивости к гипоксии) и две контрольные группы.

#### Путь введения и используемые дозы

Для пептидных препаратов выбор пути введения не является очевидным – пероральный (внутрижелудочный зондовый) исключен, так как пептиды крайне быстро разрушаются ферментами пищеварительного тракта животных. Инъекционные пути введения, включая внутрибрюшинный, также не являются допустимыми, так как пептиды быстро разрушаются пептидазами крови и тканей, а в брюшной полости активно захватываются перитонеальными макрофагами. Интраназаль-

ное введение препаратов животным сложно воспроизводимо по техническим причинам.

Поэтому для исследования пептидных препаратов у лабораторных животных обычно используют или внутривенное введение, или ректальное введение. В своих исследованиях мы остановились на ректальном как технически более простом и не вызывающем травматические повреждения черепа животных. Наличие таких повреждений исключает возможность проведения как барокамерных исследований, так и тестирования работоспособности в течение длительного периода после введения препаратов.

Разовую дозу непосредственно перед введением растворяли в 0,2 мл 5%-го раствора крахмальной слизи. Вводили металлическим зондом ректально. После чего животное фиксировали в положении вниз головой на пять минут для предотвращения обратного высвобождения раствора.

Исследуемые соединения вводились лабораторным животным однократно в утренние часы, за час до планируемого тестирования переносимости физической нагрузки или гипоксии. Контрольным животным вводили эквивалентное количество физиологического раствора в 5%-м растворе крахмальной слизи.

Дозировки препаратов определяли, исходя из рекомендуемых для человека средних терапевтических доз, с учетом поправочных коэффициентов видового переноса, принятого в проведении доклинических исследований [12]. Таким образом, для «Даларгина» применялась доза 0,56 мг/кг, для «Семакса» – 0,22 мг/кг, «Кортексина» – 1 мг/кг, экспериментальных пептидных препаратов – 2,5 мг/кг. При подготовке дозировок комбинированных препаратов указанные дозы не корректировались, и комбинированный препарат представлял собой сумму пептидных компонентов.

#### Методика хроматографического исследования

Исследование выполнено методом ВЭЖК (гельпроникающая хроматография) с внутренним стандартом. В качестве растворителя использован раствор натрия хлористого 0,15 М в фосфатном буфере при pH=7,0. Стандартный раствор готовили из стандартных образцов смеси калибровочных белков для гельпроникающей хроматографии (GE GelFiltrationCalibrationKit LMW, кат. №28-4038-41 или аналогичного качества) и стандартного образца даларгина (ООО «Бион», №/ЛС-000531 или аналогичного качества). По результатам хроматографирования смеси стандартных образцов белков (рис. 1) строилась градуировочная зависимость от носительного объема удерживания от молекулярной массы белков в координатах  $K_{av}$ , IgMg (рис. 2).

Условия хроматографирования:

– хроматографическая колонка, заполненная модифицированным силикагелем, размером 7,8x300 мм, зернением 3 мкм (например, PhenomenexYata SEC-2000 или аналогичная);

– подвижная фаза – раствор натрия хлористого 0,15 М в фосфатном буфере при pH=7,0;

– скорость потока – 1,0 мл/мин;

– температура хроматографической колонки – 25 °С;

– детектор – УФ, 240 нм;

– объем пробы – 50 мкл;

– время хроматографирования – 20 мин.

При проведении анализа внутренний стандарт добавлялся как в смесь стандартного образца субстанции, так и в испытуемую пробу. Количество вносимого внутреннего стандарта фиксировано и составляет 0,5 мг/мл.

При проведении количественного определения площади пиков стандартов сгруппированы в группы в соответствии с их молекулярной массой и сравниваются не напрямую, а кос-

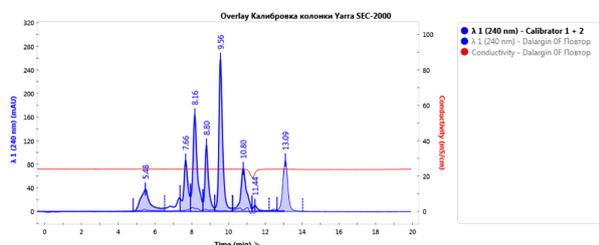


Рис. 1. Типичный вид хроматограммы СО калибровочного раствора белков (GelFiltrationCalibrationKit LMW) и СО калибровочного раствора «Даларгина»  
 Fig. 1. Typical chromatogram of a standard protein calibration solution (GelFiltrationCalibrationKit LMW) and a standard dalargin calibration solution

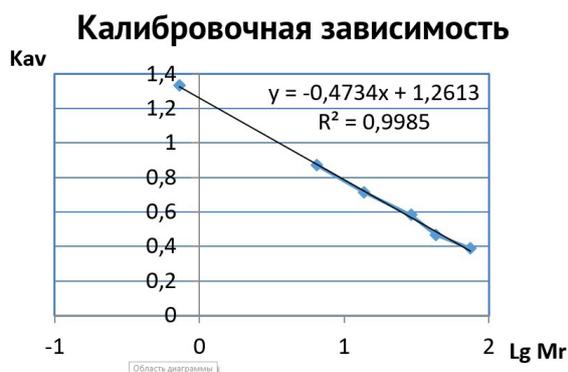


Рис. 2. Типичный вид градуировочной зависимости СО калибровочных растворов (GelFiltrationCalibrationKit LMW) и СО «Даларгина»  
 Fig. 2. Typical calibration curve of a standard protein calibration solution (GelFiltrationCalibrationKit LMW) and a standard sample of dalargin

венно – через площадь пика внутреннего стандарта.

Последовательность определения:

1. Проводят анализ смеси стандартного образца и внутреннего стандарта, размечают пики и измеряют их площади.
2. Для каждого компонента стандарта субстанции рассчитывают относительные факторы отклика (относительно внутреннего стандарта).
3. В тех же условиях проводят анализ пробы с добавкой внутреннего стандарта, размечают пики группы пиков (по времени удерживания) и внутреннего стандарта, измеряют их площади.
4. Для каждой группы пиков суммируют их площадь и вычисляют отношение суммарной площади к площади пика внутреннего стандарта.
5. Установив отношение площади группы пиков к площади пика внутреннего стандарта, а также относительный фактор отклика, для каждой группы пиков производят расчет их количества в аликвоте пробы, введенной в хроматограф.

Относительные факторы отклика определяются по следующим формулам (для каждой группы пиков на хроматограмме стандартов):

$$k_1 = (S_{ct} IS / S_{ct} 1) \times (X_{ct} 1 / X_{ct} S);$$

$$k_2 = (S_{ct} IS / S_{ct} 2) \times (X_{ct} 2 / X_{ct} S);$$

$$k_3 = (S_{ct} IS / S_{ct} 3) \times (X_{ct} 3 / X_{ct} S);$$

где

$k_1$  – относительный фактор отклика для 1-й группы пиков;

$S_{ct} 1$  – площадь 1-й группы пиков стандартного образца;

$S_{ct} IS$  – площадь пика внутреннего стандарта (на хроматограмме стандартов);

$X_{ct} 1$  – количество (или масса) стандарта 1-й группы пиков в объеме стандартного образца, введенного в хроматограф;

$X_{ct} IS$  – количество (или масса) внутреннего стандарта в объеме стандартного образца, введенного в хроматограф.

Формулы расчета для каждой группы пиков выглядят следующим образом:

$$X_p 1 = k_1 \times (n_{IS} / S_{IS}) \times S_p 1;$$

$$X_p 2 = k_2 \times (n_{IS} / S_{IS}) \times S_p 2;$$

$$X_p 3 = k_3 \times (n_{IS} / S_{IS}) \times S_p 3,$$

где

$X_1$  – количество (или масса) 1-го аналита в объеме пробы, введенной в хроматограф;

$k_1$  – фактор отклика для 1-го аналита;

$S_p 1$  – площадь 1-й группы пиков;

$S_{IS}$  – площадь пика внутреннего стандарта (на хроматограмме пробы);

$n_{IS}$  – количество (или масса) внутреннего стандарта в объеме пробы, введенной в хроматограф.

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В качестве примера на рис. 3 представлены хроматографические профили некоторых проанализированных нейропептидов.

В табл. 1 представлены относительные массовые профили исследуемых пептидов.

Анализ табл. 1 показывает, что синтетические пептидные препараты («Семакс», «Даларгин») имеют только один диапазон молекулярно-массового распространения, что является ожидаемым, так как их молекулярная масса менее 1 кДа.

Обращает на себя внимание, что объединение этих двух препаратов в одной водной фазе ведет к

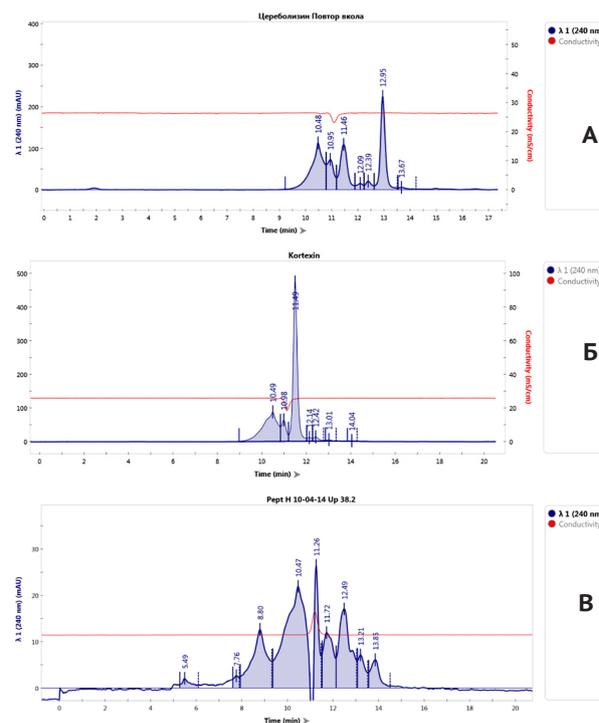


Рис. 3. Хроматографические профили некоторых пептидов, включенных в исследование. А – «Церебролизин», В – «Кортексин», С – нейропептидный комплекс из гиппокампа головного мозга животных  
 Fig. 3. Chromatographic profiles of some peptides included in the study. A – Cerebrolysin, B – Cortexin, C – neuropeptide complex of the animal brain's hippocampus

существенному изменению молекулярно-массового распределения: значительная часть пептидов смеси имеет молекулярную массу в диапазоне от 1 до 5 кДа, отсутствующую у исходных соединений. Вероятно, эти пептиды вступают в физико-химическое взаимодействие с образованием агрегатов или комплексных солей друг с другом.

«Кортексин» имеет молекулярно-массовое распределение в трех диапазонах, а природные пептидные комплексы из тканей мозга – в четырех.

Результаты изучения биологической активности пептидных препаратов представлены в табл. 2.

С целью дальнейшего анализа проведено ранжирование пептидов по выраженности биологического действия (табл. 3).

Анализ табл. 3 показывает, что некоторые пептиды оказывают преимущественно антигипоксическое действие («Кортексин», пептидные комплексы из ствола и коры мозга) или стимулирование работоспособности («Даларгин», «Семакс», «Семакс» + «Даларгин», пептидные комплексы «Д» и «Е»). В то же время, сочетание «Кортексина» с «Даларгином», а также

Относительные молекулярные профили исследуемых пептидов  
Relative molecular profiles of the studied peptides

Табл. 1.  
Table 1.

| Препараты или пептидные комплексы            | Доля фракций, %                         |       |       |       |
|--|---|-------|-------|-------|
|  | Молекулярно-массовое распределение, кДа |       |       |       |
|  | 30–10                                   | 10–5  | 5–1   | >1    |
| «Даларгин»                                   |   |       |       | 98    |
| «Семакс»                                     |   |       |       | 100   |
| «Кортексин»                                  |   | 33,37 | 62    | 3     |
| «Кортексин» + «Даларгин»                     |   | 5     | 18    | 77    |
| «Семакс» + «Даларгин»                        |   |       | 75,55 | 24    |
| ППК «А» – гиппокамп                          | 14,88                                   | 38,73 | 39,11 | 4,77  |
| ППК «Б» – ствол мозга                        | 2,54                                    | 43,5  | 49,04 | 4,92  |
| ППК «В» – кора мозга                         | 11,39                                   | 35,39 | 43,15 | 5,4   |
| ППК «Г» – различные отделы мозга, комбинация | 30                                      | 36,27 | 25,51 | 5,58  |
| ППК «Д» – различные отделы мозга, комбинация | 13,83                                   | 25,63 | 23,54 | 35,48 |
| ППК «Е» – различные отделы мозга, комбинация | 12,7                                    | 20,23 | 48,87 | 18,2  |

Биологическая активность исследуемых пептидных препаратов (M±m)  
Biological activity of the studied peptide drugs (M±m)

Табл. 2.  
Table 2.

| № препарата | Препарат                                     | Гипоксия |           | Работоспособность |           |
|-------------|--|----------|-----------|-------------------|-----------|
|             |  | ВЖ, с    | Т-баллы   | ВП, с             | Т-баллы   |
| 0           | Контроль                                     | 95 ± 3   | 50 ± 1    | 135 ± 6           | 50 ± 2    |
| 1           | «Даларгин»                                   | 170 ± 8  | 79 ± 3    | 201 ± 12          | 331±38    |
| 2           | «Семакс»                                     | 218 ± 23 | 97 ± 9    | 221 ± 60          | 397 ± 198 |
| 3           | «Кортексин»                                  | 201 ± 11 | 91 ± 4    | 172 ± 44          | 235 ± 143 |
| 4           | «Кортексин» + «Даларгин»                     | 250 ± 15 | 110 ± 5   | 275 ± 62          | 576 ± 202 |
| 5           | «Семакс» + «Даларгин»                        | 293 ± 25 | 126 ± 10  | 198 ± 10          | 319 ± 33  |
| 6           | ППК «А» – гиппокамп                          | 532 ± 47 | 418 ± 128 | 309 ± 71          | 684 ± 233 |
| 7           | ППК «Б» – ствол мозга                        | 538 ± 23 | 418 ± 73  | 186 ± 27          | 280 ± 90  |
| 8           | ППК «В» – кора мозга                         | 552 ± 44 | 460 ± 130 | 289 ± 66          | 621 ± 215 |
| 9           | ППК «Г» – различные отделы мозга, комбинация | 551 ± 46 | 456 ± 135 | 373 ± 95          | 896 ± 311 |
| 10          | ППК «Д» – различные отделы мозга, комбинация | 498 ± 30 | 298 ± 87  | 369 ± 92          | 886 ± 300 |
| 11          | ППК «Е» – различные отделы мозга, комбинация | 487 ± 22 | 267 ± 67  | 344 ± 61          | 800 ± 200 |

пептидный комплекс из гиппокампа и комплекс «Г» пептидов мозга проявляют сбалансированное действие, примерно в равной степени влияя и на устойчивость к гипоксии, и на работоспособность.

Ранговый коэффициент корреляции между показателями активности пептидов равен 0,62, что свидетельствует об умеренной статистически значимой связи между ними.

При анализе такого показателя, как сумма рангов эффектов, видно, что пептиды могут быть разбиты на три подгруппы по выраженности своего действия. Так, в исследованных средних терапевтических дозах активность «Даларгина», «Семакса», «Кортексина» и сочетания «Даларгина» с «Кортексином» и «Семаксом» может считаться умеренной. Активность пептидных комплексов из гиппокампа и ствола мозга, пептидных комплексов «Д» и «Е» может считаться средней. Активность пептидного комплекса из коры и комплекса «Г» может считаться высокой.

В графическом варианте указанные особенности пептидных препаратов представлены на рис. 4.

Полученные результаты свидетельствуют о вариативности эффектов изучаемых препаратов, связанных с их свойствами. К числу таких свойств могут быть отнесены доза изучаемых препаратов и их физико-химические особенности.

Для оценки влияния дозы препаратов на их активность был выполнен однофакторный дисперсионный анализ. Диапазон вводимых доз для изучаемых препаратов варьировал от 0,22 мг/кг («Семакс») до 8,06 мг/кг (ППК «Е» – различные отделы мозга, комбинация). В целях анализа они были сгруппированы в три уровня: низкие (до 2 мг/кг), средние (до 5 мг/кг) и высокие (более 5 мг/кг). Контрольные животные формировали группу «0».

Результаты дисперсионного анализа фактора дозы по видам активности пептидов представлены в табл. 4.

Таким образом, фактор дозы играет существенную роль в выраженности биологического эффекта изучаемых пепти-

дов (от 30 до 40% вариабельности степени эффекта зависит от дозы препарата). Коэффициенты ранговой корреляции дозы препарата с выраженностью антигипоксического эффекта, стимуляции работоспособности и общей эффективности (по сумме рангов) равны 0,47, 0,69 и 0,67 соответственно.

Обращает на себя внимание, что все пептиды, отнесенные к группе умеренной активности, попали в группу низкой вводимой дозы. Вероятно, умеренная активность изучаемых пептидов (особенно в отношении влияния на работоспособность, для которой характерны более высокая корреляционная связь и несколько больший коэффициент детерминации

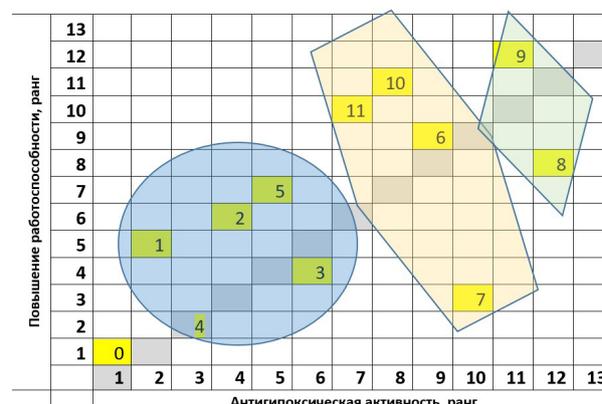


Рис. 4. Графическая характеристика биологической активности пептидов

Fig. 4. Graphic characteristics of the biological activity of peptides

Примечание: обозначение пептидных препаратов в поле рисунка (на желтом фоне) соответствует номерам препаратов в табл. 2 и 3. Диагональная зона отражает сбалансированность эффектов.

Note: the designation of peptide drugs in the field of the figure (yellow background) corresponds to the drug numbers in Tables 2 and 3. Diagonal zone reflects the balance of effects

Ранговая оценка биологической активности пептидных препаратов  
Ranking by the biological activity of peptide drugs

Табл. 3.  
Table 3.

| № препарата | Препарат                                     | Устойчивость к гипоксии | Работоспособность | Сумма рангов | Преобладание эффекта |
|-------------|--|-------------------------|-------------------|--------------|----------------------|
| 0           | Контроль                                     | 1                       | 1                 | 2            | Баланс               |
| 1           | «Даларгин»                                   | 2                       | 5                 | 7            | Работа               |
| 2           | «Семакс»                                     | 4                       | 6                 | 10           | Работа               |
| 3           | «Кортексин»                                  | 6                       | 4                 | 10           | Гипоксия             |
| 4           | «Кортексин» + «Даларгин»                     | 3                       | 2                 | 5            | Баланс               |
| 5           | «Семакс» + «Даларгин»                        | 5                       | 7                 | 12           | Работа               |
| 6           | ППК «А» – гиппокамп                          | 9                       | 9                 | 18           | Баланс               |
| 7           | ППК «Б» – ствол мозга                        | 10                      | 3                 | 13           | Гипоксия             |
| 8           | ППК «В» – кора мозга                         | 12                      | 8                 | 20           | Гипоксия             |
| 9           | ППК «Г» – различные отделы мозга, комбинация | 11                      | 12                | 23           | Баланс               |
| 10          | ППК «Д» – различные отделы мозга, комбинация | 8                       | 11                | 19           | Работа               |
| 11          | ППК «Е» – различные отделы мозга, комбинация | 7                       | 10                | 17           | Работа               |

Результаты дисперсионного анализа влияния фактора «Доза препарата» на биологическую активность пептидных препаратов

Табл. 4.

The results of dispersion analysis of the effect of the "Drug Dose" factor on the biological activity of peptide drugs

Table 4.

| Активность                            | Центроиды групп, Т-баллы |        |         |         | Степень влияния, D | Достоверность, p    |
|---------------------------------------|--------------------------|--------|---------|---------|--------------------|---------------------|
|                                       | 0                        | Низкий | Средний | Высокий |                    |                     |
| Антигипоксическая, Т-баллы            | 50                       | 91     | 174     | 341     | 0,31               | 7x10 <sup>-30</sup> |
| % от контроля                         | 100                      | 182    | 349     | 681     |                    |                     |
| Стимуляция работоспособности, Т-баллы | 50                       | 323    | 540     | 861     | 0,40               | 10 <sup>-11</sup>   |
| % от контроля                         | 100                      | 647    | 1081    | 1722    |                    |                     |

факторной модели) была связана с более низкой дозой их введения. Для препаратов со средней и высокой активностью такой закономерности не выявлено. Вероятно, для этих препаратов более значимым является фактор их состава.

В качестве характеристики состава пептидных комплексов в данной работе мы использовали характеристики их молекулярно-массового распределения (табл. 1). С учетом выделения четырех диапазонов масс, доля массы пептидов в соответствующем диапазоне определялась как самостоятельный фактор для дисперсионного анализа.

Так как для факторного анализа необходима группировка данных по уровням анализируемого фактора, на основе частотного анализа были определены границы диапазонов молекулярно-массового распределения.

Они составили для диапазона:

- 30–10 кДа: 10 и 25% (менее 10% – низкий уровень, от 11 до 25% – средний, более 25% – высокий);
- 10–5 кДа: 10 и 35% (менее 10% – низкий уровень, от 11 до 35% – средний, более 35% – высокий);
- 5–1 кДа: 30 и 60% (менее 30% – низкий уровень, от 31 до 60% – средний, более 60% – высокий);
- Менее 1 кДа: 10 и 50% (менее 10% – низкий уровень, от 11 до 50% – средний уровень, более 50% – высокий).

В табл. 5 представлены результаты дисперсионного факторного анализа влияния пептидов на устойчивость к гипоксии, в табл. 6 – на работоспособность животных.

При анализе табл. 5 обращает на себя внимание, что уровень антигипоксической активности пептидов фактически не зависит от доли пептидов в массовом диапазоне 30 – 10 кДа,

но их присутствие при этом является крайне необходимым. Выполненный анализ фактора присутствия пептидов выявил коэффициент детерминации модели D=0,52 при p=10<sup>-59</sup>.

Таким образом, для реализации высокой антигипоксической активности пептидные комплексы должны иметь присутствие на минимальном уровне (до 10%) компонентов с массой 30–10 кДа, высокий уровень (более 35%) присутствия компонентов с массой 10–5 кДа, средний уровень (от 30 до 60%) присутствия компонентов с массой 5–1 кДа и невысокий (до 50%) уровень пептидов в диапазоне менее 1 кДа.

При анализе табл. 6 обращает на себя внимание, что уровень способности пептидов стимулировать работоспособность фактически не зависит от доли пептидов в массовом диапазоне 30–10 кДа и 10–5 кДа, но их присутствие при этом является крайне необходимым. Выполненный анализ фактора присутствия пептидов выявил коэффициент детерминации модели D=0,43 при p=5x10<sup>-13</sup> для диапазона 30–10 кДа и D=0,38 при p=3x10<sup>-11</sup> для диапазона 10–5 кДа.

Таким образом, для реализации высокой способности стимулировать работоспособность пептидные комплексы должны иметь средний или высокий уровень присутствия (более 10%) компонентов с массой 30–10 кДа, низкий уровень (до 10%) присутствия компонентов с массой 10–5 кДа, низкий или средний уровень (до 60%) присутствия компонентов с массой 5–1 кДа и низкий (до 10%) уровень пептидов в диапазоне менее 1 кДа.

Объединяя описание пептидных комплексов с максимальной эффективностью в отношении как антигипоксической активности, так и физической работоспособ-

Результаты дисперсионного анализа влияния молекулярно-массового распределения по диапазонам масс на устойчивость к гипоксии

Табл. 5.

The results of dispersion analysis of the effect of molecular weight distribution over mass ranges on resistance to hypoxia

Table 5.

| Диапазон                                      | Центроиды групп по уровням, Т-баллы |         |         | Степень влияния, D | Достоверность, p    |
|---|-------------------------------------|---------|---------|--------------------|---------------------|
|   | низкий                              | средний | высокий |                    |                     |
| 30–10 кДа                                     | 417                                 | 361     | 456     | 0,02               | 0,74                |
| 10–5 кДа                                      | 110                                 | 118     | 438     | 0,44               | 10 <sup>-20</sup>   |
| 5–1 кДа                                       | 148                                 | 391     | 101     | 0,33               | 10 <sup>-15</sup>   |
| 1–0 кДа                                       | 178                                 | 172     | 93      | 0,10               | 2x10 <sup>-7</sup>  |
| Коэффициент множественной детерминации модели |                                     |         |         | 0,28               | 5x10 <sup>-11</sup> |

Результаты дисперсионного анализа влияния молекулярно-массового распределения по диапазонам масс на стимулирование работоспособности  
 The results of dispersion analysis of the effect of molecular weight distribution over mass ranges on performance stimulation

| Диапазон                                      | Центроиды групп по уровням, Т-баллы |         |         | Степень влияния, D | Достоверность, p   |
|---|-------------------------------------|---------|---------|--------------------|--------------------|
|   | низкий                              | средний | высокий |                    |                    |
| 30–10 кДа                                     | 280                                 | 748     | 897     | 0,14               | 0,13               |
| 10–5 кДа                                      | 576                                 | 640     | 620     | 0,01               | 0,97               |
| 5–1 кДа                                       | 786                                 | 597     | 105     | 0,36               | 3x10 <sup>-6</sup> |
| 1–0 кДа                                       | 543                                 | 330     | 211     | 0,09               | 0,02               |
| Коэффициент множественной детерминации модели |                                     |         |         | 0,20               | 5x10 <sup>-4</sup> |

ности, можно сконструировать ориентировочный вариант хроматограммы оптимального пептида. По трем из четырех диапазонов массы компонентов удастся определить универсальную оптимальную структуру. По одному диапазону оптимальная массовая доля будет варьировать в зависимости от доминирующего вида желательной активности:

- в диапазоне 30–10 кДа – около 10%;
- в диапазоне 10–5 кДа – более 35% при доминировании антигипоксической активности и менее 10% – при доминировании влияния на работоспособность, от 10 до 35% – при сбалансированной активности;
- в диапазоне 5–1 кДа – от 30 до 60%;
- в диапазоне менее 1 кДа – до 10%.

Таким образом, можно предположить, что именно пептидные компоненты с массой в диапазоне от 10 до 5 кДа определяют специфическую антигипоксическую активность природных нейропептидных комплексов. Пептидные компоненты в других массовых диапазонах при оптимальных значениях определяют неспецифическую активность пептидных препаратов.

На рис. 5 представлены сформированные по результатам исследования модельные хроматограммы оптимальных пептидных комплексов.

Оба анализируемых фактора (доза и структура) являются значимыми и статистически достоверными. В связи с этим нами была рассчитана двухфакторная модель влияния на биологическую активность пептидных препаратов. Она представлена в табл. 7

Полученная двухфакторная модель является значимой и достоверной. Она описывает более 70% всей вариативности как индивидуальной устойчивости к гипоксии, так и физической работоспособности животных при использовании нейропептидных препаратов.

### ВЫВОДЫ

Результаты исследования позволили нам сделать ряд выводов:

1. Антигипоксическая активность и стимулирование работоспособности в той или иной степени присущи всем исследуемым пептидным препаратам, являются дозозависимыми и связанными с особенностями молекулярно-массового распределения пептидных компонентов.
2. Установлено, что специфическая антигипоксическая активность пептидных препаратов из тканей мозга связана с компонентами, имеющими диапазон масс от 5 до 10 кДа.

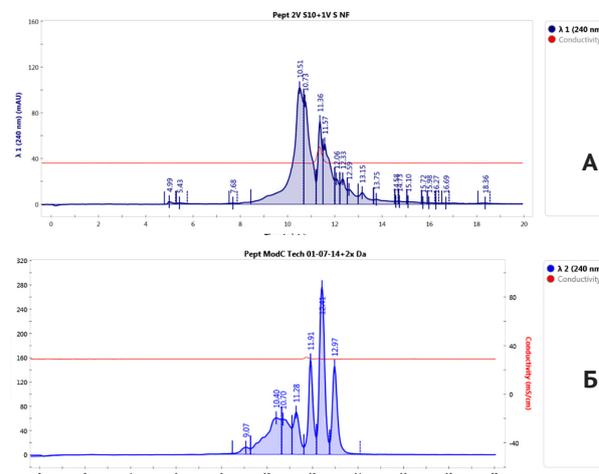


Рис. 5. Условные хроматограммы оптимальных пептидов. А – с антигипоксической активностью, Б – со стимулирующей активностью в отношении физической работоспособности  
 Fig. 5. Conditional chromatograms of optimal peptides. A – with antihypoxic activity, B – with stimulating activity in relation to physical performance

Двухфакторная модель (доза и структура) влияния введения пептидных препаратов на их биологическую активность

Two-factor model (dose and structure) for the effect of the administration of peptide drugs on the biological activity

| Фактор  | Антигипоксическая активность |                     | Повышение работоспособности |                    |
|---|------------------------------|---------------------|-----------------------------|--------------------|
|   | Степень влияния, D           | Достоверность, p    | Степень влияния, D          | Достоверность, p   |
| Фактор А – доза                                     | 0,31                         | 7x10 <sup>-30</sup> | 0,40                        | 10 <sup>-17</sup>  |
| Фактор В – структура                                | 0,28                         | 10 <sup>-9</sup>    | 0,20                        | 5x10 <sup>-4</sup> |
| Взаимодействие А*В                                  | 0,14                         | 2x10 <sup>-7</sup>  | 0,17                        | 2x10 <sup>-4</sup> |
| Суммарно контролируемые факторы и их взаимодействие | 0,73                         | 6x10 <sup>-15</sup> | 0,77                        | 6x10 <sup>-8</sup> |
| Не контролируемые факторы                           | 0,27                         |                     | 0,23                        |                    |

3. Определены оптимальные для реализации биологической активности соотношения долей пептидных компонентов по диапазонам масс.

4. Характерные виды нейропротекторной активности пептидных препаратов (антигипоксическая и стимулирование работоспособности) в той или иной степени присущи всем исследуемым пептидным препаратам, являются дозозависимыми и связанными с особенностями молекулярно-массового распределения пептидных компонентов.

5. Специфическая антигипоксическая активность нейропептидов во многом связана с пептидными компонентами массой 5–10 кДа. Пептидные компоненты массой от 30 до 10 кДа и менее 5 кДа в основном определяют неспецифическую нейропротекторную активность, включая активирующее дей-

ствие, выявляемое по способности повышать физическую работоспособность.

6. Хроматографические характеристики (молекулярно-массовое распределение по диапазонам масс) природных нейропептидных комплексов могут быть использованы для прогнозирования выраженности их биологических эффектов.

Таким образом, результаты нашего исследования подтвердили многочисленные исследования других научных коллективов, проведенные в течение последних десятилетий, и показали, что к числу типичных фармакологических эффектов относятся антигипоксическое действие, как проявление универсального нейропротекторного эффекта, и способность повышать физическую работоспособность, как проявление активирующего эффекта препаратов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ашмарин, И.П. Ноотропный аналог адренокортикотропина 4-10 Семакс (15-летний опыт разработки и изучения / И.П. Ашмарин, В.Н. Незавибадько, И.Ф. Мясоедов [и др.] // Журнал высшей нервной деятельности. – 1997. – Т. 47. – Вып. 1. – С. 420–430.

2. Новиков, В.С. Дезадаптационные состояния человека при экстремальных воздействиях и их коррекция / В.С. Новиков, С.И. Сороко, Е.Б. Шустов. – Санкт-Петербург: Политехника-принт, 2018. – 548 с.

3. Хавинсон, В.Х. Пептидэргическая регуляция гомеостаза / В.Х. Хавинсон, И.М. Кветной, Г.А. Рыжак // Успехи современной биологии. – 2002. – Т. 122. – № 2. – С. 190–203.

4. Шустов, Е.Б. Пептидная биорегуляция резистентности к экстремальным воздействиям / Е.Б. Шустов, М.Т. Гасанов, Г.Д. Капанадзе [и др.] // Биомедицина. – 2018. – № 2. – С. 4–14.

5. Ястребов, Д.В. Эффективность пептидных биорегуляторов при экстремальных воздействиях / Д.В. Ястребов, М.Ю. Бахтин. – Санкт-Петербург: Наука, 1997. – 70 с.

6. Каркищенко, Н.Н. Очерки спортивной фармакологии. Т. 3. Векторы фармакорегуляции / Н.Н. Каркищенко, В.В. Уйба, В.Н. Каркищенко [и др.]; под редакцией Н.Н. Каркищенко, В.В. Уйба. – Москва, Санкт-Петербург: Айсинг, 2014. – 356 с.

7. Каркищенко, Н.Н. Биомедицинское (доклиническое) изучение антигипоксической активности лекарственных

средств: методические рекомендации. МР21-44-2017 / Н.Н. Каркищенко, В.Н. Каркищенко, Е.Б. Шустов [и др.] – Москва: ФМБА России, 2017. – 98 с.

8. Шустов, Е.Б. Анализ параметров индивидуальной устойчивости лабораторных животных к гипоксии в интересах биологического моделирования нейропротекторного и антигипоксического действия лекарственных средств / Е.Б. Шустов, Н.Н. Каркищенко, В.В. Каркищенко [и др.] // Биомедицина. – 2013. – № 4. – С. 149–157.

9. Каркищенко, В.Н. Особенности интерпретации показателей физической работоспособности лабораторных животных по показателям плавательных тестов / В.Н. Каркищенко, Н.Н. Каркищенко, Е.Б. Шустов [и др.] // Биомедицина. – 2016. – № 4. – С. 34–46.

10. Каркищенко, Н.Н. Биомедицинское (доклиническое) изучение лекарственных средств, влияющих на физическую работоспособность: методические рекомендации. МР21.43 / Н.Н. Каркищенко, В.Н. Каркищенко, Е.Б. Шустов [и др.] – Москва: ФМБА России, 2017. – 133 с.

11. Оковитый, С.В. Работоспособность. Утомление. Коррекция / С.В. Оковитый, Е.Б. Шустов, В.Ц. Болотова. – Москва: КНОРУС, 2019. – 330 с.

12. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. – Москва: Ремедиум, 2000. – 398 с.

## ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

**Евгений Борисович Шустов**, профессор, д-р мед. наук, профессор кафедры фармакологии и клинической фармакологии Санкт-Петербургского государственного химико-фармацевтического университета Министерства здравоохранения Российской Федерации», Санкт-Петербург, Россия; главный научный сотрудник Института токсикологии Федерального медико-биологического агентства России, Санкт-Петербург, Россия; e-mail: shustov-msk@mail.ru

**Дмитрий Юрьевич Ивкин**, доцент, канд. биол. наук, доцент кафедры фармакологии и клинической фармакологии Санкт-Петербургского государственного химико-фармацевтического университета Министерства здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург, Россия; e-mail: dmitry.ivkin@pharminnovtech.com

**Арина Сергеевна Ивкина**, научный сотрудник центра экспериментальной фармакологии Санкт-Петербургского государственного химико-фармацевтического университета Министерства здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург, Россия; e-mail: arina.ivkina@pharminnovtech.com

**Алексей Евгеньевич Ким**, канд. мед. наук, преподаватель кафедры патологической физиологии Военно-медицинской академии имени С.М. Кирова Министерства обороны Российской Федерации, Санкт-Петербург, Россия; e-mail: alexpann@mail.ru

**Станислав Людвигович Люблинский**, канд. биол. наук, заведующий лабораторией Научного центра биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства России, Москва, Россия; e-mail: scbmt@yandex.ru

**Максим Сергеевич Нестеров**, заведующий лабораторией биоаналитических исследований Научного центра биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства России, Москва, Россия; e-mail: mdulya@gmail.com

#### ADDITIONAL INFORMATION ABOUT AUTHORS

**Evgeny B. Shustov**, Professor, Doctor of Medicine (MD), Professor of the Department of Pharmacology and Clinical Pharmacology, Saint Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University, Saint Petersburg, Russia; Chief Researcher, Institute of Toxicology of Federal Medico-Biological Agency, Saint Petersburg, Russia; e-mail: shustov-msk@mail.ru

**Dmitry Y. Ivkin**, Associate Professor, Ph.D. in Biology, Associate Professor of the Department of Pharmacology and Clinical Pharmacology, Saint Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University, Saint Petersburg, Russia; e-mail: dmitry.ivkin@pharminnotech.com

**Arina S. Ivkina**, Researcher at the Center for Experimental Pharmacology, Saint Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University, Saint Petersburg, Russia; e-mail: arina.ivkina@pharminnotech.com

**Alexey E. Kim**, Ph.D. in Medicine, Teacher of the Department of Pathological Physiology, S.M. Kirov Military Medical Academy, Saint Petersburg, Russia; e-mail: alexpann@mail.ru

**Stanislav L. Lublinsky**, Ph.D. in Biology, Head of the Laboratory of the Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia, Moscow, Russia; e-mail: scbmt@yandex.ru

**Maxim S. Nesterov**, Head of the Bioanalytical Research Laboratory of the Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia, Moscow, Russia; e-mail: mdulya@gmail.com

**Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.**

## Search for the optimal mass profile of neuropeptides for the implementation of antihypoxic and activating actions

©2020. E.B. Shustov<sup>1,2</sup>, D.Y. Ivkin<sup>2\*</sup>, A.S. Ivkina<sup>3</sup>, A.E. Kim<sup>3</sup>, S.L. Lublinsky<sup>4</sup>, M.S. Nesterov<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Saint Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University, Saint Petersburg, Russia

<sup>2</sup> Institute of Toxicology of Federal Medico-Biological Agency, Saint Petersburg, Russia

<sup>3</sup> S.M. Kirov Military Medical Academy, Saint Petersburg, Russia

<sup>4</sup> Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia, Saint Petersburg, Russia

\* e-mail: dmitry.ivkin@pharminnotech.com

Received December 03, 2020;

Revised December 23, 2020;

Accepted December 24, 2020

In this study, the dependence of the pharmacological effects of neurotropic peptides of natural and synthetic origin on their structure was studied in laboratory rats. First, the study of the relative molecular profiles of peptide complexes was carried out using HPLC (gel-penetrating chromatography) with an internal standard. Then peptide complexes were administered to animals rectal and verified their biological activity on two independent models – antihypoxic activity (method of altitude the lift timing of the animal's life at a critical height) and the model of assessment of physical performance (time of forced swim test of animals with a load of 10% of the body weight to failure). The obtained data on biological activity (increase) were compared with the features of the structure of peptides. To assess the effect of drug doses on their activity, a single-factor analysis of variance was performed.

It has been shown that antihypoxic activity and performance stimulation are more or less inherent in all the studied peptide preparations, and are dose-dependent and related to the features of the molecular mass distribution of peptide components. It was also found that the specific antihypoxic activity of peptide preparations from brain tissues is associated with components having a mass range from 5 to 10 kDa. The optimal proportions of the peptide components for the implementation of biological activity by mass ranges were determined.

In addition, the chromatographic characteristics (molecular weight distribution over mass ranges) of natural neuropeptide complexes can be used to predict the severity of their biological effects.

**KEYWORDS:** neuropeptides; chromatography; statistical modeling; antihypoxic activity; productivity; laboratory animals