

Патогенетическое обоснование применения модифицированных форм и пептидных аналогов эритропоэтина как цитопротекторов

©2020. И.М. Иванов¹, А.С. Никифоров¹, Н.Г. Венгерович^{1,2*}, В.В. Перелыгин², Ю.А. Прошина¹

¹ Государственный научно-исследовательский испытательный институт военной медицины Министерства обороны Российской Федерации, Санкт-Петербург, Россия

² Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет Министерства здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург, Россия

* e-mail: nickolai.vengerovich@pharminnotech.com

Поступила в редакцию 01.12.2019 г.

После доработки 05.01.2020 г.

Принята к публикации 04.03.2020 г

Представлен обзор данных экспериментальных и клинических исследований о кроветворных и некроветворных тканезащитных эффектах эритропоэтина. Обобщена информация о его побочном действии (стимуляция опухолевого роста, аутоиммунные реакции, артериальная гипертензия и др.), ограничивающем клиническое применение в качестве цитопротектора. Рассмотрены известные модификации молекулы эритропоэтина, обладающие тканезащитным эффектом. В частности, десалирированный, карбоксилированный и глутаральдегидный аналоги цитокина.

Приведены результаты медико-биологических исследований, описывающих тканезащитные эффекты данных соединений, а также возможные механизмы их рецепторного действия. Рассмотрены основные короткоцепочечные миметики эритропоэтина, воспроизводящие отдельные активные участки аминокислотной последовательности цитокина (11–25 аминокислот): Helix B, ARA290, Eportis, Eropetide-ab, МК-X, Erobis, NL100. Также описаны биохимические механизмы цитопротективного действия эритропоэтина и его производных, включающие связывание с гетеродимерным рецептором некроветворных тканей и активацию внутриклеточных сигнальных молекул, обладающих свойствами ингибиторов апоптоза.

Отмечено, что тканезащитное действие эритропоэтина *in vivo* наблюдается в гемостимулирующих дозах и сопровождается побочными эффектами. При этом применение модифицированных форм эритропоэтина и его короткоцепочечных пептидных аналогов, имеющих высокое сродство к изоформе эритропоэтинового рецептора некроветворных тканей и не обладающих при этом гемопоэтическими свойствами, позволяет избежать развития побочных явлений и снизить эффективные дозы в 10–20 раз.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: эритропоэтин; короткоцепочечные пептиды; цитокин; ишемия; цитопротекция; алкилирующие агенты; радиомиметический синдром; свободные радикалы

DOI: 10.17816/phf21382/2713-153X-2020-1-2-70-81

СОКРАЩЕНИЯ:

ГКСФ – гранулоцитарный колониестимулирующий фактор;

ГМ-КСФ – гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (ГМ-КСФ);

ИЛ – интерлейкин;

Эпо – эритропоэтин;

asialoEPO – десалирированное производное эритропоэтина;

CEPO – карбоксилированное производное эритропоэтина;

EPOR – гемопоэтический рецептор;

GEPO – глутаральдегидное производное эритропоэтина.

ВВЕДЕНИЕ

Экстремальные факторы химической и радиационной этиологии вызывают структурные и функциональные изменения в клетках, приводящие к их гибели. Причем механизм повреждений в обоих случаях имеет сходный характер. В результате воздействия ионизирующего излучения образуются свободные радикалы, которые способствуют повреждению ДНК и запуску процесса апоптоза. Изменения в пуле размножающихся элементов (миелобласты, промиелоциты, миелоциты) обусловлены интерфазной гибелью клеток.

Большинство синтетических противоопухолевых препаратов (антибиотики антрациклинового ряда, соединения алкилирующего типа действия, антиметаболиты) также оказывают влияние на активно пролиферирующие клетки и индуцируют апоптоз. Например, алкилирующие агенты (циклофосфан, циклофосамид, сарколизин) способны ковалентно присоединять алкильные радикалы к активным группам нуклеотидов. Алкилированию подвергаются азотистые (пуриновые и пиримидиновые) основания, фосфатные группы молекулы ДНК. В результате нарушаются процессы репликации и транскрипции ДНК, возникают митотические блоки, подавляется синтез РНК и белка, что приводит к несбалансированному росту и гибели клеток.

Алкилирующие агенты поражают активно пролиферирующие клетки костного мозга, что приводит к миелосупрессии. В результате снижаются показатели лейко- и тромбоцитопоза, абсолютное число Т- и В-лимфоцитов, подавляется пролиферация лимфоцитов, ингибируется синтез антител. Кроме того, в результате гидролитического расщепления некоторых алкилирующих агентов могут образовываться ониевые соединения, обладающие высокой реакционной способностью. При ионизации воды формируются активные свободные радикалы и перекисные соединения, воздействие которых на клетки сходно с эффектом ионизирующих излучений («радиомиметический синдром»). Нарушаются процессы пролиферации и дифференцировки клеток костного мозга, развивается атрофия лимфоидной ткани. В селезенке и лимфатических узлах отмечают резко выраженный склероз. Супрессивное действие алкили-

рующих агентов подавляет как клеточный, так и гуморальный компонент иммунной системы организма. Снижение иммунных свойств вследствие лейкопении и истощения организма повышает вероятность инфекционных осложнений.

В настоящее время в качестве лечебно-профилактических средств, предназначенных для терапии осложнений лучевой терапии и воздействия алкилирующих веществ, рассматриваются биополимеры микробного происхождения, антиоксиданты, стероиды и цитокиновые факторы роста. При этом наибольший практический интерес представляют колониестимулирующие факторы, которые действуют на относительно дифференцированные клетки – предшественники гемопоэза: эритропоэтин (Эпо), гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (ГКСФ), гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (ГМ-КСФ).

ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Обобщить и систематизировать фактическую информацию об эффектах Эпо и его пептидных аналогов в качестве цитопротекторов.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Эритропоэтин, входящий в суперсемейство цитокинов 1-го типа, играет ключевую роль в продукции эритроцитов. Структурно Эпо состоит из 4 α-спиралей (A–D), соединенных петлями. Одна молекула Эпо взаимодействует с предварительно димеризованным Эпо-рецептором через два отдельных сайта связывания: сайт-1, который локализован в области спиралей A, B, и D и части АВ-петли, и сайт-2, локализованный в области петель A и C (рис. 1).

Эпо оказывает действие через гемопоэтический рецептор (EPOR), представляющий собой гомодимер, состоящий из двух идентичных субъединиц и поддерживающий гемопоэз в ответ на уровень циркулирующего Эпо порядка 1–10 пМ [1].

В настоящее время применение Эпо рекомендовано при комбинированных или сочетанных радиационных поражениях, сопровождающихся длительно персистирующей анемией, а также для ускорения восстановления уровня тромбоцитов в крови. При однократном введении в дозе 7 Гр через 24 ч после облучения крыс радиозащитный эффект Эпо проявлялся в увеличении выживаемости, ослаблении выраженности миелосупрессии и панцитопении, увеличении числа лимфоцитов и лейкоцитов в периферической крови и клеточного состава костного мозга и селезенки. На фоне применения Эпо, за счет повышающей регуляции противовоспалительного подтипа α-7 Н холинорецепторов (α-7-nAChR), активации антиапоптозного внутриклеточного сигнального пути через фермент Янус-киназа-2 (JAK-2), передатчик сигнала и активатор транскрипции 3 (STAT-3), уменьшаются показатели индуцированного облучением оксидативного стресса. Также активируется ядерный фактор, связанный с ядерным эритроидным фактором-2 (Nrf-2), участвующим в цитопротекции. Таким образом, каскад внеклеточных и внутриклеточных сигнальных молекул α-7-nAChR-JAK-2/STAT-3-Nrf-2 вовлечен в реализацию лечебного эффекта Эпо при облучении.

Применение Эпо в качестве гемопоэтического фактора при облучении, а также при воздействии алкилирующими веществами представляет практический интерес. В последнее время все больше внимания в научной литературе уделяют

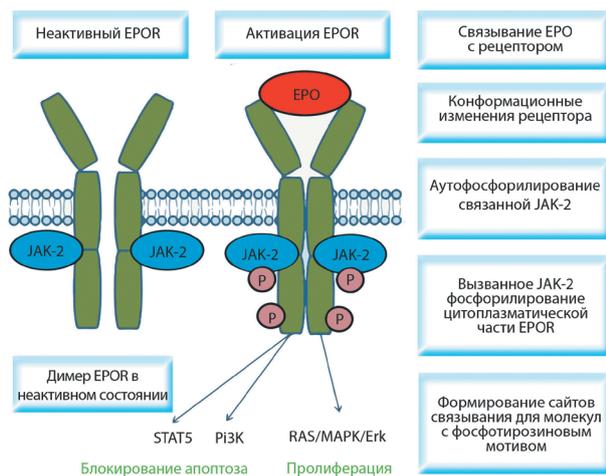


Рис. 1. Схема взаимодействия Эпо с EPOR и каскад внутриклеточных событий
Fig. 1. Scheme of interaction of Epo with EPOR and the cascade of intracellular events

некроветворным эффектам Эпо. В частности, его трофическому, нейропротекторному и тканезащитному действию в различных моделях повреждения клеток.

1. Негемопоэтические эффекты Эпо

В последние годы стало очевидным, что Эпо обладает рядом биологических эффектов, которые могут быть обозначены как антагонистическое действие в отношении провоспалительных цитокинов и их негативного влияния при повреждении тканей [2]. Эти эффекты проявляются трофическим и нейропротективным действием [3].

При реализации негемопоэтического эффекта Эпо продуцируется локально, в непосредственной близости от места повреждения. Перекрестное взаимодействие между циркулирующим и локальным тканезащитным пулами Эпо не происходит из-за наличия изоформ Эпо-рецептора, значительно различающихся по своему сродству к цитокину. В противоположность этому рецептор тканезащитного эффекта Эпо постулирован как гетеромер, состоящий из EPOR в комплексе с субъединицей CD131 (так называемый общий β рецептор), входящий в состав рецепторов цитокинов 1-го типа (GM-CSF, интерлейкин-3 (ИЛ-3), ИЛ-5 и др.) [4].

Рецептор тканезащитного эффекта обладает меньшим сродством к Эпо (2 20 нМ) и поэтому не отвечает на концентрации Эпо, присутствующие в плазме крови, а только на относительно высокие уровни локально вырабатываемого Эпо. Важное функциональное разделение между гематopoэтической и тканезащитной системой проистекает из различий в базальной экспрессии соответствующих рецепторов. Участвующий в гемопоэзе гомодимер продолжительно экспрессируется популяциями клеток-предшественников кроветворения, которые для своего выживания требуют постоянной концентрации циркулирующего Эпо. В противоположность этому тканезащитный рецептор обычно экспрессируется только в случае повреждения или выраженного метаболического стресса и требует кратковременного воздействия Эпо для запуска пролонгированного биологического эффекта [2].

Цитопротективный эффект Эпо показан на различных моделях повреждения тканей: ишемизированных кожных лоскутах [5], ишемия-реперфузии в кожно-мышечных лоскутах [6], операционных ранах и кишечных анастомозах, а также на моделях неишемизированных, инфицированных ран [7], при ишемическом поражении головного мозга и компрессионных поражениях спинного мозга. В других моделях

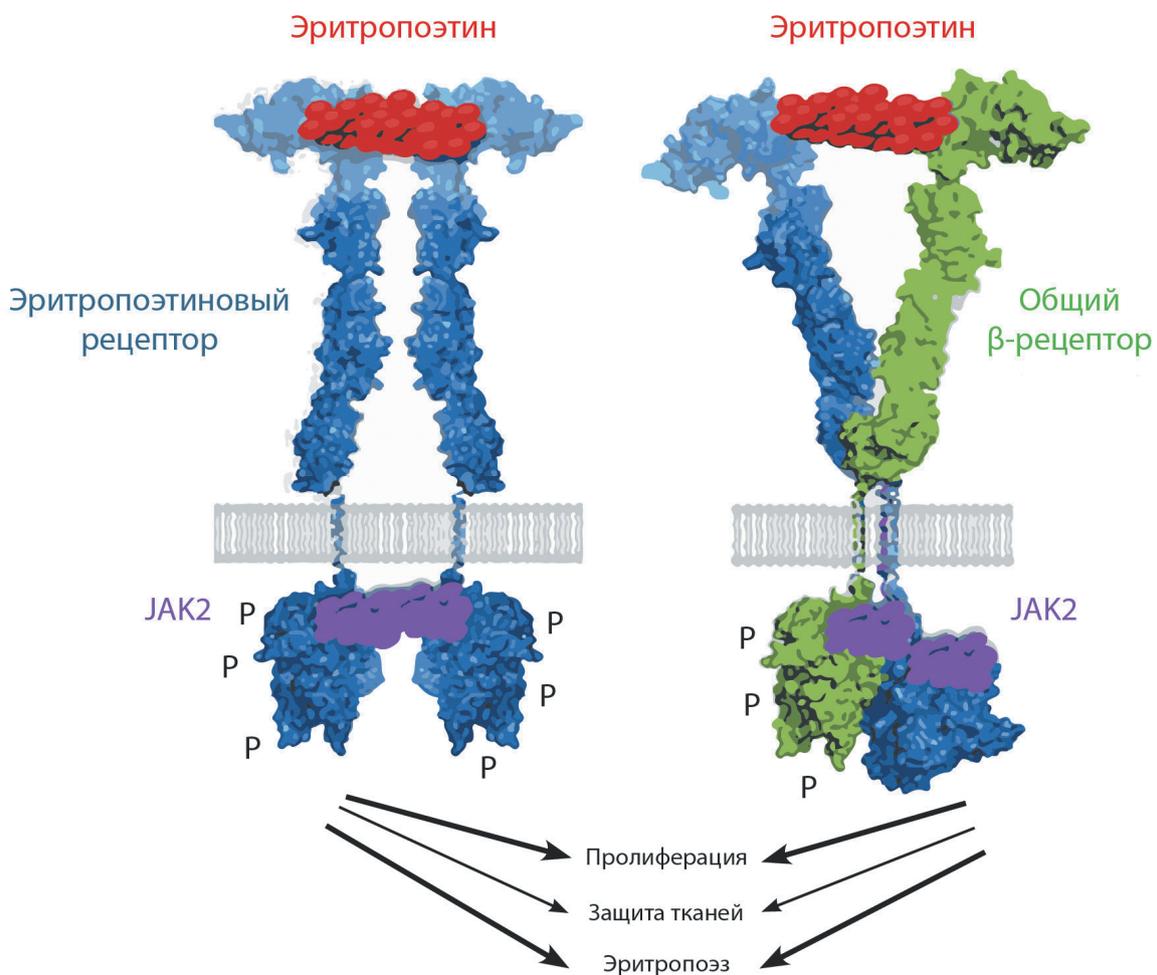


Рис. 2. Схема взаимодействия Эпо с EPOR*EPOR кроветворных тканей и с гетеродимерным EPOR βCR некроветворных тканей
 Fig. 2. Scheme of interaction of Epo with EPOR of hematopoietic tissues and with heterodimeric EPOR βCR of non-blood-forming tissues

Эпо увеличивает формирование и качество грануляционной ткани [8]. Активация Эпо-рецепторов ЦНС (EpoRs) предотвращает апоптоз, вызванный NMDA или NO посредством активации Jak-2, NF-κB-опосредованную транскрипцию нейрорепрессивных генов, а также фосфорилирование ингибитора NF-κB (IκB) с последующей транслокацией фактора транскрипции NF-κB в ядро [9].

В экспериментах на культурах клеток и моделях неврологических заболеваний животных продемонстрирован нейрорепрессивный эффект Эпо [10]. На модели внутрисердечного кровотечения у мышей введение рекомбинантного Эпо приводило к уменьшению повреждения посредством двух механизмов. Во-первых, цитокин уменьшал гибель клеток путем апоптоза через угнетение экспрессии TNF-α, Fas и мРНК Fas-L и ингибирование активности каспазы-8, -9 и -3. Во-вторых, Эпо увеличивал экспрессию эндотелиальной NO-синтазы [9] и сигнальных молекул p-eNOS, pAkt, pSTAT3 и pERK, которые считаются факторами регенерации и выживания нейронов [11].

Доступной информации о безопасности и эффективности Эпо в терапии инсульта немного, и она противоречива. Многоцентровое рандомизированное клиническое исследование, проведенное в Германии в 2009 году, было отменено из-за влияния вмешивающегося фактора – рекомбинантного активатора плазминогена, который применялся совместно с Эпо у большинства пациентов [12].

2. Побочные эффекты эритропоэтина, ограничивающие его применение

2.1 Влияние эритропоэтина на неопластические процессы

Стимуляция эритропоэза связана с воздействием Эпо на соответствующие рецепторы клеток – предшественников эритропоэза с запуском последовательности сигнальных событий (ингибирование апоптоза, стимуляция пролиферации и дифференцировки). В то же время обнаружение Эпо-рецепторов в клетках опухолей позволяет выдвинуть предположение о возможной стимуляции роста опухолевой ткани при экзогенном введении Эпо [13].

Установлено, что множество типов опухолевых клеток экспрессирует Эпо-рецепторы, и показано, что Эпо-миметики пептидной природы ЕМР-1, ЕМР-9 способствуют выживанию трансплантированных мышам опухолевых клеток, тогда как антагонисты Эпо-рецептора блокируют их пролиферацию [14]. Также показано, что Эпо является митогеном для ряда опухолевых клеток [15].

Таким образом, применение Эпо потенциально может провоцировать развитие неопластического процесса или на фоне существующего процесса способствовать его прогрессированию.

2.2 Аутоиммунные реакции, потенциально связанные с применением эритропоэтина

Аутоиммунная истинная эритроцитарная аплазия является редким осложнением терапии препаратами Эпо и его производными, в частности конденсированными димерами с другими ростовыми факторами. Пик возникновения подобных случаев приходится на начало 2000-х годов и мог быть

обусловлен появлением на рынке новых дженериков Эпо низкого качества. Эритроцитарная аплазия характеризуется тяжелой анемией (требующей гемотрансфузии), ретикулоцитопенией, пониженным содержанием либо отсутствием эритробластов в красном костном мозге, циркулирующей антиЭпо антител. Подход к терапии данной патологии заключается в применении пептидных Эпо-миметиков, не обладающих кросс-реактивностью с антиЭпо антителами [16].

Одной из возможных причин формирования представлений об аутоиммунных осложнениях при применении Эпо являются результаты экспериментов на животных, которым вводили человеческий Эпо. Было установлено, что после введения коммерческих препаратов рекомбинантного Эпо животным у них возникали соответствующие антитела, которые нейтрализовали эффект препаратов, угнетали эндогенный Эпо и приводили к тяжелой аутоиммунной анемии, которая осложняла интерпретацию результатов исследования хронической токсичности рекомбинантного Эпо у животных [17]. По сообщению T. Mennini, et al., у мышей 3–4-недельное дозирование Эпо (СЕРО) приводило к формированию антител к эндогенному Эпо и снижению гематологических показателей [18].

Несмотря на то, что аутоиммунные реакции являются редкими при терапии человеческим Эпо в клинике, потенциальная тяжесть этих осложнений требует повышенного внимания к данному вопросу и определяет жесткие требования к технологии получения препарата, направленные на снижение его иммуногенности.

2.3 Влияние эритропоэтина на уровень артериального давления

Обзор сведений о воздействии препаратов Эпо на артериальную гипертензию, мозг и некоторые психофизиологические показатели, сексуальную функцию и общую продолжительность жизни представлены в работе A.R. Nissenson [19].

3. Модификации эритропоэтина с селективным тканезащитным эффектом

Применение Эпо в тканезащитных дозах сопровождается отмеченными выше побочными эффектами, увеличением вязкости крови и повышением тромбообразования [20]. Для преодоления развития нежелательных явлений были разработаны препараты, обладающие более высокой специфичностью к тканезащитному подтипу Эпо-рецептора и лишённые эффектов, связанных со стимуляцией системы гемопоэза. Изменения структуры Эпо, включая замену аминокислотных остатков или их химическую модификацию, приводят к снижению его аффинности к гомодимерной изоформе рецептора кроветворных тканей (EPOR*EPOR) при сохранении возможности связываться с гетеродимерным рецептором некроветворных тканей, опосредующим его тканезащитное действие [4].

К числу таких препаратов относятся asialoEPO – десиалированное производное Эпо, СЕРО – карбоксилированное производное Эпо [21], GEPO – глутаральдегидное производное Эпо, и пептиды, воспроизводящие отдельные участки аминокислотной последовательности цитокина. Исследования препаратов привели к пониманию еще больших различий в

биологической роли эритропоэтического и тканезащитного рецептора. Гематопоэтические Эпо-рецепторы трансформируют эндотелий в протромботическое состояние, увеличивают количество и реактивность тромбоцитов, увеличивают системное артериальное давление вследствие спазма гладкой мускулатуры сосудов. Активация тканезащитного Эпо-рецептора не приводит к этим эффектам [22].

3.1. Тканезащитные эффекты модифицированного Эпо (asialoEPO, CEPO и GEPO)

Модифицированный эритропоэтин (asialoEPO), лишенный сиаловых кислот, при введении в организм быстро разрушается в крови, не оказывает влияния на эритроцитарное звено гемопоэза, но обладает тканезащитным действием.

Цитопротективное действие asialoEPO продемонстрировано на модели повреждения кардиомиоцитов, вызванного цитостатином [23], на модели пневмосклероза, вызванного блеомицином [24], на модели бокового амиотрофического склероза при ишемических и компрессионных повреждениях головного и спинного мозга, на модели ишемии-реперфузии миокарда [25] и почек [26], на модели ишемии-реперфузии мозга, вызванной окклюзией среднетазовой артерии [27] и двусторонней окклюзией сонных артерий [28], на модели токсической кардиомиопатии, вызванной доксорубицином [29], а также на модели генетически обусловленной кардиомиопатии [29].

Кроме того, препарат стимулирует дифференцировку клеток – предшественников олигодендроцитов в головном мозге крыс после перинатальной гипоксии-ишемии, обладает нейропротективным, тканезащитным и противоапоптотическим эффектами за счет снижения экспрессии провоспалительных цитокинов TNF- α и IL-6 на модели грыжи поясничного отдела позвоночника [30] и ишемии-реперфузии тонкой кишки [31].

В отношении CEPO показан нейропротективный эффект в ряде моделей нейротоксичности у животных, включая ишемический инсульт, сдавление седалищного нерва, сдавление спинного мозга, периферическую нейропатию [21]. В исследованиях на крысах и мышах показано отсутствие влияния препарата на эритропоэз даже после длительного применения в высоких дозах [21].

В дальнейшем на различных моделях поражений головного и спинного мозга было подтверждено, что нейропротективное действие CEPO также связано с его противовоспалительным и противоапоптотическим эффектом: травматическое повреждение мозга [32], множественный ишемический инсульт, частичная перерезка спинного мозга [33], повреждение спинного мозга при ишемии/реперфузии [34] и фокальная ишемия головного мозга [33, 35]. В относительно недавних исследованиях показан нейропротективный эффект CEPO на моделях таких заболеваний ЦНС, как болезнь Альцгеймера [36], болезнь Паркинсона [37] и перивентрикулярная лейкомаляция [38].

Тканезащитный эффект CEPO продемонстрирован при терапии инфицированных ран, язвенных пролежней (рекуррентная ишемия-реперфузия) и перитонита [7]. Цитопротективный эффект CEPO, связанный с активацией сигнального пути PI3-K/Akt, показан на модели хронической сердечной

недостаточности у крыс, вызванной введением изопротеннола [39], и на модели ишемии-реперфузии почек у крыс [40]. Нейропротективный эффект CEPO установлен на моделях нарушений обучения и памяти у крыс, вызванных интрагиппокампальным введением амилоидного пептида. Нейропротективные механизмы CEPO связаны с модуляцией активности факторов P38, ERK, MMP-2 и восстановлением активности сигнального пути Akt/GSK-3 β [41].

На модели кардиомиопатии у крыс, вызванной богатой углеводами и жирами пищей и введением стрептозоцина, CEPO уменьшал выраженность апоптоза миокарда и сохранял целостность внутриклеточных структур. Отмечено ингибирование экспрессии каспазы-3 и белка Bcl-xl (маркеры апоптоза), а также увеличение уровня экспрессии PI3K (p85) и Akt1 на уровне РНК и белка [42]. На модели диабетической ретинопатии, вызванной введением стрептозоцина, CEPO уменьшал величину отека, число микроаневризм сосудов сетчатки, а также снижал экспрессию глиального фибриллярного кислого белка (GFAP) и эндотелиального фактора роста сосудов (VEGF-A) [43].

На модели диффузного повреждения мозга у крыс (модель ускорения при ударе) CEPO снижал выраженность отека мозга, повышал порог открытия митохондриальной поры переменной проницаемости (mPTP), снижал выраженность морфологических признаков разрушения митохондрий в астроцитах и уменьшал экспрессию каспазы-3 (маркер апоптоза) [44].

Профилактическое введение крысам CEPO приводит к ингибированию экспрессии про-апоптотического белка Cc3 в мозге и регулирует соотношение Bcl-2/Bax, что в конечном счете ограничивает апоптоз нейронов и характеризуется защитным эффектом на модели внутриматочной гипоксии-ишемии [45].

CEPO обладает и радиозащитным действием. В дозе 50 мкг/кг при курсовом внутривентральном введении в течение 10 дней цитокин улучшал функциональное состояние крыс, в том числе функции высшей нервной деятельности, и ограничивал область некроза мозга после облучения отдельных областей головы животных в дозах до 100 Гр [46]. В то же время применение CEPO после облучения мозга крысят в дозе 6 Гр не способствовало улучшению показателей, характеризующих интенсивность нейрогенеза [47], но достоверно снижало число клеток с апоптозом с 25 до 15% по сравнению с контролем [48].

Несмотря на достаточный массив экспериментальных данных, подтверждающий нейропротективный и тканезащитный эффекты CEPO на различных моделях повреждения головного и спинного мозга, механизмы этого эффекта остаются во многом неизученными. При изучении механизмов нейропротективного действия CEPO на модели *in vitro* депривации глюкозы и кислорода культуры клеток первичных нейронов и на модели *in vitro* гипоксии-реоксигенации у мышей было показано, что цитокин активирует протеинкиназу B (AKT) посредством глиального нейротрофического фактора (GDNF).

Рецептором CEPO в тканях головного мозга является гетеродимерный комплекс, состоящий из субъединицы общего β -рецептора (CD131) и субъединицы Эпо-рецептора. Фарма-

кологическая блокада CD131-рецептора и/или продукции GDNF или рецептора GDNF нивелирует нейропротективное действие СЕРО. Таким образом, цитопротективный эффект СЕРО в нейрональной ткани реализуется через сигнальный путь CD131/GDNF/АКТ [49]. Кроме того, эффекты Эпо и СЕРО в некроветворных тканях опосредуются гетеродимерным рецептором, состоящим из Эпо-субъединицы и общей β -субъединицы цитокиновых рецепторов (EPOR* β cR). Эта субъединица входит также в состав рецепторов цитокинов 1-го типа ГМ-КСФ, ИЛ-3, ИЛ-5 [50].

Эпо опосредует антиапоптозный эффект в дифференцированных клеточных линиях SH-SY5Y и PC-12 за счет связывания с классическим гомодимерным Эпо-рецептором [51], в которых не экспрессируется β cR. Прямое подтверждение участия тех или иных подтипов рецепторов в реализации нейропротективного эффекта Эпо получено методами фармакологического зондирования. Эффекты Эпо полностью блокировались введением антител к EPOR и ослаблялись в присутствии антител к β cR [52].

Предполагается, что как гомодимерные EPOR*EPOR, так и гетеродимерные EPOR* β cR могут быть вовлечены в реализацию нейропротективной активности Эпо в различных типах нервных клеток. Установлено, что СЕРО не связывается с классическим EPOR и может связываться только с гетеродимером EPOR* β cR [52].

В исследованиях *in vitro* B. Sturm, et al. [53] показал, что СЕРО увеличивает экспрессию белка фратаксина, играющего важную роль в работе митохондрий и связанного с развитием болезни наследственной атаксии Фридрейха, в культуре эритролейкемических клеток K562 и в не экспрессирующей EPOR-линии клеток моноцитарной лейкемии ТНР-1. Это указывает на то, что, во-первых, эффект СЕРО на уровень экспрессии фратаксина не зависит от участия классических EPOR и, во-вторых, на клетках моноцитарно-лейкоцитарного звена может присутствовать тканезащитная изоформа EPOR* β cR, с которой связывается СЕРО.

Показано, что СЕРО увеличивает уровень пролиферации клеток в культуре первичных эмбриональных нейронов мыши после депривации кислорода и глюкозы, но не обладает таким же эффектом в линии клеток Neuro-2a, в которых не экспрессируются β cR. Эти данные подтверждают участие β cR в реализации эффектов СЕРО в клетках, не относящихся к эритроцитарному звену гемопоэза.

В аспекте нейропротекции СЕРО, по-видимому, активирует те же антиапоптотические сигнальные пути, что и Эпо. В клеточной линии нейробластомы SH-SY5Y показаны сходные механизмы, опосредованные Jak-2 и PI3K, в реализации антиапоптотического действия как Эпо, так и СЕРО [52].

Действие СЕРО по усилению роста аксонов и формированию дендритных шипиков сопровождается повышением экспрессии двух известных постсинаптических белков Shank2 и Shank3 за счет повышающей регуляции CREB-связывающего белка (CBP) и E1A-связанного белка (p300), гистоновой ацетилтрансферазы, которая ацетирует гистоны и, таким образом, регулирует функции нейрона. Сигнальный путь от СЕРО к CBP/p300 включает фосфорилирование STAT-3 (передатчик сигнала и активатор транскрипции 3), Erk (внеклеточная сигнал-регулируемая

киназа) и АКТ [54], тогда как в клетках линий UT-7 и TF-1 СЕРО вызывает фосфорилирование Jak-2, но не вызывает активации сигналов запуска пролиферации клеток, таких как Erk1/2, ядерный фактор-кВ и STAT-5.

Отмечается, что различия в эффектах СЕРО и Эпо могут быть связаны с некоторыми критическими точками во внутриклеточных сигнальных путях. М. Е. Chamorro, et al. [52] показано, что СЕРО блокирует фосфорилирование транскрипционного фактора семейства Forkhead FOXp3 и не вызывает последующей понижающей регуляции p27kip1 в клетках линий UT-7 и TF-1. В противоположность этому активация пролиферации клеток Эпо сопровождается увеличением фосфорилирования FOXO3a и снижением регуляции его мишени на пути распространения внутриклеточного сигнала p27kip1.

Все вышеперечисленные механизмы действия СЕРО указывают на вовлеченность множества сигнальных путей в реализацию биологических эффектов, хотя полностью их не раскрывают.

Помимо СЕРО, цитопротективным и антиапоптозным действием обладает GEPO. Разработанная модифицированная форма Эпо лишена эритропоэтической активности, но оказывает выраженное тканезащитное действие. Эффективность GEPO показана *in vitro* в культуре клеток линий P19 и HEK293. GEPO связывается с гетеродимерным рецептором IL3RB*EPOR, который в последующем запускает сигнальный путь Bcl-2 (маркер антиапоптозной активности). Кроме того, в реализацию эффектов GEPO может быть вовлечена сигнальная молекула Jak-2, поскольку применение ее ингибитора AG490 подавляло активацию Bcl-2.

Цитопротективное действие GEPO, которое проявлялось на гистологическом и функциональном уровне [55], а также на модели цитотоксического действия наночастиц серебра в культуре клеток почки HEK293, показано на модели повреждения почек в результате ишемии-реперфузии. GEPO увеличивает число выживших клеток, предотвращает развитие выраженных альтераций морфологии клеток и сохраняет их пролиферативную активность и, кроме того, снижает выраженность процессов оксидативного стресса (генерации реактивных форм кислорода) и повышает экспрессию антиапоптотического белка Bcl2 [56].

3.2 Пептидные производные эритропоэтина, обладающие тканезащитными свойствами

Наибольший интерес представляют пептидные производные Эпо, объединяющие две большие группы – Эпо-миметики и пептиды с тканезащитным действием. Первая группа пептидов не воспроизводит участков последовательности аминокислот исходного белка, однако связывается с кроветворным Эпо-рецептором и запускает каскад процессов, приводящих к стимуляции гемопоэза. Пептиды второй группы частично повторяют последовательность аминокислот участка Эпо, ответственного за связывание с тканезащитными рецепторами, и оказывают защитное действие на моделях повреждения тканей.

В настоящее время разработан и активно исследуется пептид Helix-B, представляющий собой аминокис-

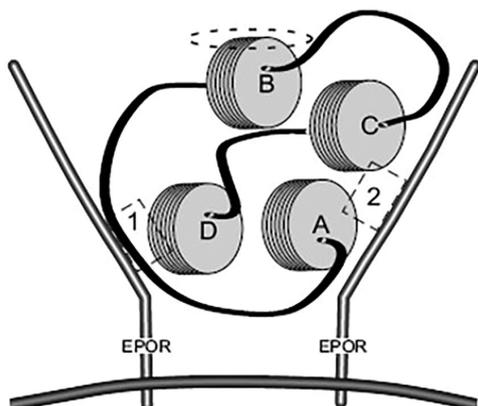


Рис. 3. Схема взаимодействия Эпо и Эпо-рецептора кроветворных тканей: А, В, С, D – «глобулы» белка; области 1 и 2 – критические области для взаимодействия с рецептором кроветворных тканей (по [4])

Fig.3. Scheme of interaction of Epo and Epo-receptor of blood-forming tissues: A – A, B, C, D – “globules” of the protein; areas 1 and 2 are critical areas for interaction with the hematopoietic tissue receptor (according to [4])

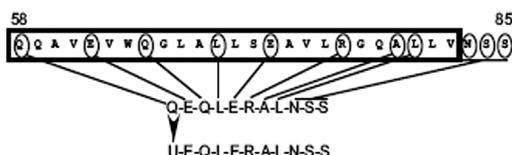


Рис. 4. Участок аминокислотной последовательности Helix-B, не участвующий во взаимодействии с рецептором, а также логика разработки пептида HBSP. Нижний ряд – производное с пироглутаматом вместо глутаминовой кислоты (pHBSP) (по [4])

Fig.4. A portion of Helix-B protein acid that is not involved in interaction with the receptor, and also the development logic of the HBSP peptide, the bottom row is the derivative with pyroglutamate instead of glutamic acid (pHBSP) (according to [4])

лотную последовательность участка 58–82 молекулы Эпо (QQAVEVWQGLALLSEAVLRGQALLV). Пептид Helix-B обладает свойствами нейропротектора *in vitro* и тканепротектора *in vivo* в различных моделях, включая ишемический инсульт, диабетический отек сетчатки, травму периферических нервов. Вероятно, пептид может выступать в качестве факторов роста. По своему нейропротективному действию на каинатной модели эффективность Helix-B была схожа с Эпо (в опытах *in vitro* в концентрации 5 нг/мл эффект равен 100 нг/мл Эпо). В опытах *in vivo* пептид в дозе 4,4 мкг/кг оказывал эффект по ограничению объема инсульта, аналогичный СЕРО в дозе 44 мкг/кг, и улучшал функцию нерва при диабетической нейропатии [4].

На основе Helix-B синтезированы короткоцепочечные пептиды, состоящие из смежных аминокислот. Наибольшая активность среди производных Helix-B отмечена у препарата HBSP (peptide G). Схема взаимодействия Эпо с рецептором кроветворных тканей, объясняющая теоретические предпосылки для разработки тканезащитных пептидов, представлена на рис. 3, 4.

Эффективность HBSP и его аналога pHBSP показана на моделях повреждения седалищного нерва, при заживлении ран, для усиления когнитивной функции у грызунов, в модели

рениальной ишемии-реперфузии, моделях инсульта. В опытах *in vitro* и *in vivo* показано кардиопротективное действие. В то же время HBSP и pHBSP не обладали эритропоэтической активностью *in vivo* или *in vitro*.

Пептидный дериват Эпо pHBSP (ARA290) исследован в опытах на мышах:

- при костномозговой форме острой лучевой болезни (ОЛБ) – общее равномерное гамма-облучение в дозе 8 Гр;

- при кишечной форме ОЛБ – общее облучение в дозе 13 Гр или неполное облучение только желудочно-кишечного тракта в дозе 15 Гр [57].

В опытах на модели костномозговой формы ОЛБ препарат вводили однократно, курсом 10 сут или 29 сут, в дозах 30 мкг/кг или 60 мкг/кг. Лечение начинали через 24 ч после облучения. Выявлено, что только 29-дневное введение препарата оказало заметное влияние на выживаемость животных. Так, 30-дневная выживаемость мышей возросла с 8,6 в контроле до 35,7% в опытной группе. ARA290 при введении в дозе 60 мкг/кг курсом 10 сут либо однократно оказался неэффективен.

В опытах на модели кишечной формы ОЛБ препарат вводился подкожно, однократно, а также курсом в течение 10 или 20 дней, в дозах 30, 60, 120 мкг/кг. По сравнению с контрольными экземплярами, после введения ARA290 снижение смертности наблюдалось во всех диапазонах доз. При однократном введении наибольшая выживаемость отмечена после введения ARA290 в дозе 60 мкг/кг. Увеличение курса введения до 10 дней не способствовало повышению эффективности препарата. Однако введение в дозе 30 мкг/кг в течение 20 дней оказалось высокоэффективным [57, 58].

При изучении механизмов радиозащитного действия ARA290 показано, что препарат в дозе 30 мкг/кг не влияет на регенерацию кишечного эпителия, однако в дозах 60–120 мкг/кг способствует понижению уровня циркуляции TNF α, вызванного облучением.

На основе данных о третичной/четвертичной кристаллической структуре комплекса эритропоэтина с его рецептором разработан неэритрогенный нейропротектор пептидной природы Epotris (последовательность QLHVDHAVSGLRSLTLLRA), который по химической структуре соответствует С-концевому участку региона альфа-спирали (последовательность аминокислот 92–111) Эпо человека. Взаимодействие пептида с Эпо-рецептором кроветворных тканей в 1000 раз меньше, чем у целого белка. Как и Эпо, Epotris проникает через ГЭБ, ослабляет нейротоксические эффекты каината, однако не стимулирует эритропоэз.

В литературе присутствует информация об исследованиях пептидного аналога Эпо Eropptide-ab, представляющего собой последовательность из 17 аминокислот (AENCSLNENITVPTDKV), соответствующую области АВ-петли Эпо (последовательность аминокислот 30–47), который обладает активностью, сходной с целым белком. Нейропротективный эффект Eropptide-ab подтвержден в опытах *in vivo* на модели ишемического повреждения нейронов [59]. Пептид вызывает дифференцировку и пре-

дотвращает клеточную гибель в клеточных линиях нейробластомы мышей и человека. При этом Eрореptide-ab не вызывает пролиферации кроветворных клеток в препарате клеток селезенки мышей.

Биологическая активность в нервных клетках блокируется в присутствии антител к внеклеточному домену Эпо-рецептора, что указывает на опосредование биологического эффекта Eрореptide-ab в нервных клетках через Эпо-рецептор. При локальном введении мышам Eрореptide-ab отмечается увеличение спрутинга концевых пластинок мотонейронов в иннервируемых ими мышцах. Этот эффект сходен с действием цилиарного нейротрофического фактора. Таким образом, нервная и другие некроветворные ткани отвечают на сигнальное влияние пептидной последовательности из Эпо, что предполагает различия в рецепторах нейротрофического и гематопозитического действия Эпо.

Разработан короткоцепочечный пептид МК-X (ISGLRSLTLLRALGAQKELM), воспроизводящий участок Эпо с низкой афинностью связывания с рецептором и обладающий тканезащитным эффектом. Показано, что пептид МК-X ослабляет выраженность гибели нейронов в ответ на воздействие реактивных форм кислорода в условиях оксидативного стресса, аналогично Эпо. Пептид вызывает длительную активацию ERK1/2 (внеклеточная сигнал-регулирующая протеинкиназа) и АКТ. Введение ингибиторов ERK1/2 и АКТ нивелирует нейропротективный эффект МК-X. В отличие от Эпо, МК-X не вызывает пролиферацию нейрональных клеток [60].

В сравнительном исследовании пептида МК-X и Эпо на модели ишемического инсульта с реперфузией, вызванного у крыс окклюзией средней мозговой артерии, показан нейропротективный эффект пептида, который проявляется в ограничении области инсульта. В подтверждающих исследованиях *in vitro* пептид ослаблял выраженность митохондриальной дисфункции и последующей гибели нейронов в культуре клеток в условиях глутамат-индуцированного оксидативного стресса наравне с Эпо. На биохимическом уровне отмечено, что МК-X значительно снижает расщепление каспазы-3 и транслокацию в ядро апоптоз-индуцирующего фактора. Эффект пептида полностью соответствует Эпо по выраженности активации JAK-2 и PI3K/AKT и ERK1/2 [61].

Пептид на основе последовательности сайта-1 Эпо (остатки 36–53 в структурной модели комплекса Эпо с рецептором) Eробis приводит к росту аксонов в первичной культуре гиппокампа и нейронов мозжечка. Eробis обладает свойствами цитопротектора для нейронов *in vitro* и вызывает активацию фактора транскрипции STAT5 [62]. Также установлено, что Eробis *in vitro* стимулирует аксоногенез в культуре клеток первичных мотонейронов и обладает противовоспалительными свойствами, что проявляется в снижении выборо-

са TNF- α из активированных альвеолярных макрофагов мыши в клеточной линии AMJ2-C8 и в первичной культуре микроглии крыс. При системном введении Eробis идентифицируется в плазме и в цереброспинальной жидкости, что указывает на проникновение пептида через ГЭБ. Eробis не обладает эритропозитической активностью. При системном введении Eробis крысам на модели аутоиммунного энцефалита пептид задерживает наступление признаков поражения. Также отмечен долговременный эффект пептида на рабочую и социальную память крыс [63].

На основе структуры Eробis разработан пептид NL100 – производное консервативного участка «C-helix» молекулы Эпо. Показано, что NL100 связывается с Эпо-рецептором, вызывает рост дендритов (нейритогенез), защищает нейроны гиппокампа от оксидативного повреждения и воздействия β -амилоида *in vitro*. При этом продолжительное введение NL100 не вызывает увеличение гемопоза, в отличие от Эпо. В экспериментальных исследованиях выявлен эффект улучшения функции кратковременной памяти как у здоровых крыс, так и после центрального введения β -амилоидного пептида, а также улучшение пространственной памяти [64].

ВЫВОДЫ

На сегодняшний день не вызывает сомнений наличие цитопротекторного эффекта Эпо и его модифицированных форм. При этом к физиологически активным веществам, характеризующимся наибольшей биологической эффективностью, из числа модифицированных форм Эпо следует отнести asialoEPO, CEPO и GEPO. Из числа короткоцепочечных пептидов-миметиков – Helix B, ARA290, Eportis, Eрореptide-ab, МК-X, Eробis, NL100.

Результаты экспериментальных исследований позволяют рассматривать данные препараты не только как эффективные средства противовоспалительного и антиапоптозного действия, но и как радиозащитные и противоалкилирующие соединения. В реализацию тканезащитного действия Эпо и его производных вовлечены внутриклеточные сигнальные системы JAK-2/STAT-3, PI3K/AKT и ERK1/2, активность которых в условиях радиационного поражения окисляется скомпрометированной [65].

Применение модифицированных форм Эпо в острый период развития патологических процессов представляется сомнительным из-за высоких доз и необходимости курсового введения, в то время как использование короткоцепочечных тканезащитных пептидов позволяет избежать развития побочных явлений и снизить эффективные дозы в 10–20 раз. Это делает их перспективными для исследований в остром периоде поражений с целью предотвращения каскада патологических реакций, усиливающих тяжесть поражения и приводящих к формированию отдаленных последствий.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Jelkmann W, Bohlius J, Hallek M, Sytkowski AJ. The erythropoietin receptor in normal and cancer tissues. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 2008; 67: 39–61. DOI: 10.1016/j.critrevonc.2008.03.006.
2. Brines M, Cerami A. Erythropoietin mediated tissue protection: reducing collateral damage from the primary injury response. *J. Intern. Med.* 2008; 264: 405–32.
3. Noguchi CT, Asavaritikrai P, Teng R. Role of erythropoietin in the brain. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 2007; 64 (2): 159–71. DOI: 10.1016/j.critrevonc.2007.03.001.
4. Brines M. Erythropoietin mediates tissue protection through an erythropoietin and common beta-subunit heteroreceptor. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2004; 101: 14907–12.
5. Buemi M, Galeano M, Sturiale A, et al. Recombinant human erythropoietin stimulates angiogenesis and healing of ischemic skin wounds. *Shock.* 2004; 22: 169-73. DOI: 10.1097/01.shk.0000133591.47776.bd.
6. Harder Y, Amon M, Schramm R. Erythropoietin reduces necrosis in critically ischemic myocutaneous tissue by protecting nutritive perfusion in a dose-dependent manner. *Surgery.* 2009; 145: 372–83. DOI:10.1016/j.surg.2008.12.001.
7. Erbayraktar Z, Erbayraktar S, Yilmaz O, et al. Nonerythropoietic Tissue-Protective Compounds Are Highly Effective Facilitators of Wound Healing. *Mol. Med.* 2009; 15 (7–8): 235-41. DOI: 10.2119/molmed.2009.00051.
8. Haroon ZA, Amin K, Jiang X. A novel role for erythropoietin during fibrin-induced wound-healing response. *Am. J. Pathol.* 2003; 163: 993–1000. DOI: 10.1016/S0002-9440(10)63459-1.
9. Digicaylioglu M, Lipton SA. Erythropoietin-mediated neuroprotection involves cross-talk between Jak2 and NF-kappaB signalling cascades. *Nature.* 2001; 412: 641–7. DOI:10.1038/35088074.
10. Genc S, Koroglu TF, Genc K. Erythropoietin and the nervous system. *Brain research.* 2004; 1000 (1–2): 19–31. DOI: 10.1016/j.brainres.2003.12.037.
11. Lee ST, Chu K, Sinn DI, et al. Erythropoietin reduces perihematomal inflammation and cell death with eNOS and STAT3 activations in experimental intracerebral hemorrhage. *Journal of neurochemistry.* 2006; 96 (6): 1728–39. DOI: 10.1111/j.1471-4159.2006.03697.x.
12. Souvenir R, Doycheva D, Zhang J, Tang J. Erythropoietin in Stroke Therapy: Friend or Foe. *Current Medicinal Chemistry.* 2015; 22:10.
13. Sytkowski AJ. Does erythropoietin have a dark side? Epo signaling and cancer cells. *Sci. STKE.* 2007; 395: 38. DOI: 10.1126/stke.3952007pe38
14. Yasuda Y, Fujita Y, Matsuo T, et al. Erythropoietin regulates tumor growth of human malignancies. *Carcinogenesis.* 2003; 6: 1009–21. DOI: 10.1093/carcin/bgg060.
15. Ikeda Y, Taveira-Dasilva AM, Pacheco-Rodriguez G, et al. Erythropoietin-driven proliferation of cells with mutations in the tumor suppressor gene TSC2. *Am. J. Physiol. Lung. Cell. Mol. Physiol.* 2010; 300: 64–72. DOI: 10.1152/ajplung.00095.2010.
16. Macdougall IC. Epoetin-induced pure red cell aplasia: diagnosis and treatment. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* 2007; 6: 585–8. DOI: 10.1097/MNH.0b013e3282f0c4bf.
17. Woodburn KW, Schatz PJ, Fong KL. Erythropoiesis equivalence, pharmacokinetics and immune response following repeat hematide administration in cynomolgus monkeys. *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.* 2010; 1: 121–9. DOI: 10.1177/039463201002300111.
18. Mennini T, De Paola M, Bigini P. Nonhematopoietic Erythropoietin Derivatives Prevent Motoneuron Degeneration In Vitro and In Vivo. *Mol. Med.* 2006; 12 (7–8): 153–60. DOI: 10.2119/2006-00045.Mennini.
19. Nissenson AR, Nimer SD, Wolcott DL. Recombinant human erythropoietin and renal anemia: molecular biology, clinical efficacy, and nervous system effects. *Ann. Intern. Med.* 1991; 114 (5): 402–16. DOI: 10.7326/0003-4819-114-5-402.
20. Bennett CL, Silver SM, Djulbegovic B, et al. Venous thromboembolism and mortality associated with recombinant erythropoietin and darbepoetin administration for the treatment of cancer-associated anemia. *JAMA.* 2008; 299: 914–24. DOI: 10.1001/jama.299.8.914.
21. Leist M, Ghezzi P, Grasso G, et al. Derivatives of erythropoietin that are tissue-protective but not erythropoietic. *Science.* 2004; 305 (5681): 239–42.
22. Coleman TR, Westenfelder C, Tögel FE, et al. Cytoprotective doses of erythropoietin or carbamylated erythropoietin have markedly different procoagulant and vasoactive activities. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2006; 103: 5965–70. DOI: 10.1073/pnas.0601377103.
23. Kittur FS, Lin Y, Arthur E, et al. Recombinant asialoerythropoietin protects HL-1 cardiomyocytes from injury via suppression of Mst1 activation. *Biochem. Biophys. Rep.* 2019; 17: 157-68. DOI: 10.1016/j.bbrep.2019.01.004.
24. Sonoda A, Nitta N, Tsuchiya K, et al. Asialoerythropoietin ameliorates bleomycin-induced acute lung injury in rabbits by reducing inflammation. *Exp. Ther. Med.* 2014; 8 (5): 1443–46. DOI: 10.3892/etm.2014.1960.
25. Fiordaliso F, Chimenti S, Staszewsky L, et al. A nonerythropoietic derivative of erythropoietin protects the myocardium from ischemia-reperfusion injury. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2005; 102 (6): 2046-51. DOI: 10.1073/pnas.0409329102.
26. Nakazawa J, Isshiki K, Sugimoto T, et al. Renoprotective effects of asialoerythropoietin in diabetic mice against ischaemia-reperfusion-induced acute kidney injury. *Nephrology (Carlton).* 2010; 15 (1): 93–101. DOI: 10.1111/j.1440-1797.2009.01170.x.
27. Ishii T, Asai T, Fukuta T. A single injection of liposomal asialoerythropoietin improves motor function deficit caused by cerebral ischemia/reperfusion. *Int. J. Pharm.* 2012; 15 (439): 269–74. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2012.09.026.
28. Yamashita T, Nonoguchi N, Ikemoto T, et al. Asialoerythropoietin attenuates neuronal cell death in the hippocampal CA1 region after transient forebrain ischemia in a gerbil model. *Neurol Res.* 2010; 32 (9): 957–62. DOI: 10.1179/016164110X12700393823336.
29. Takeyama T, Takemura G, Kanamori H, et al. Asialoerythropoietin, a nonerythropoietic derivative of erythropoietin, displays broad

- anti-heart failure activity. *Circ. Heart Fail.* 2012; 1 (5): 274–85. DOI: 10.1161/CIRCHEARTFAILURE.111.965061.
30. Sasaki N, Sekiguchi M, Kikuchi S, et al. Effects of asialo-erythropoietin on pain-related behavior and expression of phosphorylated-p38 map kinase and tumor necrosis factor-alpha induced by application of autologous nucleus pulposus on nerve root in rat. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2011; 15 (36): 86–94. DOI: 10.1097/BRS.0b013e3181f137a8.
31. Mori S, Sawada T, Okada T, et al. Erythropoietin and its derivative protect the intestine from severe ischemia/reperfusion injury in the rat. *Surgery*. 2008; 143 (4): 556–65. DOI: 10.1016/j.surg.2007.12.013.
32. Adembri C, Massagrande A, Tani A. Carbamylated erythropoietin is neuroprotective in an experimental model of traumatic brain injury. *Crit Care Med.* 2008. 36 (3): 975–8. DOI: 10.1097/CCM.0b013e3181644343.
33. King VR, Averill SA, Hewazy D, et al. Erythropoietin and carbamylated erythropoietin are neuroprotective following spinal cord hemisection in the rat. *Eur J Neurosci.* 2007; 26 (1): 90–100. DOI: 10.1111/j.1460-9568.2007.05635.x.
34. Simon F, Scheuerle A, Gröger M, et al. Comparison of carbamylated erythropoietin-FC fusion protein and recombinant human erythropoietin during porcine aortic balloon occlusion-induced spinal cord ischemia/reperfusion injury. *Intensive Care Med.* 2011; 37 (9): 1525–33. DOI: 10.1007/s00134-011-2303-4.
35. Lapchak PA, Kirkeby A, Zivin JA, et al. Therapeutic window for nonerythropoietic carbamylated-erythropoietin to improve motor function following multiple infarct ischemic strokes in New Zealand white rabbits. *Brain Res.* 2008; 1238: 208–14. DOI: 10.4137/BCI.530753.
36. Armand-Ugon M., Aso E., Moreno J, et al. Memory improvement in the AbetaPP/PS1 mouse model of familial Alzheimer's disease induced by carbamylated-erythropoietin is accompanied by modulation of synaptic genes. *J. Alzheimers. Dis.* 2015; 45 (2): 407–21. DOI: 10.3233/JAD-150002.
37. Thomas Tayra J, Kameda M, Yasuhara T, et al. The neuroprotective and neurorescue effects of carbamylated erythropoietin Fc fusion protein (CEPO-Fc) in a rat model of Parkinson's disease. *Brain Res.* 2013; 1502: 55–70. DOI: 10.1016/j.brainres.2013.01.042.
38. Liu W, Shen Y, Plane JM, et al. Neuroprotective potential of erythropoietin and its derivative carbamylated erythropoietin in periventricular leukomalacia. *Exp Neurol.* 2011; 230 (2): 227–39. DOI: 10.1016/j.expneurol.2011.04.021.
39. Huang Z, Xu W, Wu J, et al. The role of PI3-K/Akt signal pathway in the antagonist effect of CEPO on CHF rats. *Exp Ther Med.* 2018; 16 (6): 5161–5. DOI: 10.3892/etm.2018.6822.
40. Tögel FE, Ahlstrom JD, Yang Y, et al. Carbamylated Erythropoietin Outperforms Erythropoietin in the Treatment of AKI-on-CKD and Other AKI Models. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2016; 27 (11): 3394–404.
41. Hooshmandi E, Motamedi F, Moosavi M, et al. CEPO-Fc (An EPO Derivative) Protects Hippocampus Against Aβ-induced Memory Deterioration: A Behavioral and Molecular Study in a Rat Model of Aβ Toxicity. *Neuroscience.* 2018; 15 (388): 405–417. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2018.08.001.
42. He H, Qiao X, Wu S, et al. Carbamylated erythropoietin attenuates cardiomyopathy via PI3K/Akt activation in rats with diabetic cardiomyopathy. *Exp Ther Med.* 2013; 6 (2): 567–73. DOI: 10.3892/etm.2013.1134.
43. Liu X, Zhu B, Zou H, et al. Carbamylated erythropoietin mediates retinal neuroprotection in streptozotocin-induced early-stage diabetic rats. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2015; 253 (8): 1263–72. DOI: 10.1007/s00417-015-2969-3.
44. Millet A, Bouzat P, Trouve-Buisson T, et al. Erythropoietin and Its Derivates Modulate Mitochondrial Dysfunction after Diffuse Traumatic Brain Injury. *J. Neurotrauma.* 2016; 33 (17): 1625–33. DOI: 10.1089/neu.2015.4160.
45. Diao M, Qu Y, Liu H, et al. Effect of carbamylated erythropoietin on neuronal apoptosis in fetal rats during intrauterine hypoxic-ischemic encephalopathy. *Biol Res.* 2019; 13 (52): 28. DOI: 10.1186/s40659-019-0234-7.
46. Woodburn KW, Schatz PJ, Fong KL. Erythropoiesis equivalence, pharmacokinetics and immune response following repeat hematide administration in cynomolgus monkeys. *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.* 2010; 1: 121–9. DOI: 10.1177/039463201002300111.
47. Osato K, Sato Y, Osato A, et al. Carbamylated Erythropoietin Decreased Proliferation and Neurogenesis in the Subventricular Zone, but Not the Dentate Gyrus, After Irradiation to the Developing Rat Brain. *Front Neurol.* 2018; 9: 738. DOI: 10.3389/fneur.2018.00738.
48. Gomez-De la Riva Á, Isla-Guerrero A, García-Grande A. Erythropoietin as a protective factor in rat CNS cells receiving radiotherapy -an in vitro study. *Rev. Neurol.* 2014; 58 (5): 199–206.
49. Ding J, Wang J, Li WY, et al. Neuroprotection and CD131/GDNF/AKT Pathway of Carbamylated Erythropoietin in Hypoxic Neurons. *Mol. Neurobiol.* 2017; 54 (7): 5051–60. DOI: 10.1007/s12035-016-0022-0.
50. Murphy JM, Young IG. IL-3, IL-5, and GM-CSF signaling: crystal structure of the human beta-common receptor. *Vitam Horm.* 2006; 74: 1–30. DOI: 10.1016/S0083-6729(06)74001-8.
51. Um MA, Gross AW, Lodish HF. “Classical” homodimeric erythropoietin receptor is essential for the antiapoptotic effects of erythropoietin on differentiated neuroblastoma SH-SY5Y and pheochromocytoma PC-12 cells. *Cell Signal.* 2007; 19 (3): 634–45. DOI: 10.1016/j.cellsig.2006.08.014.
52. Chamorro ME, Wenker SD, Vota DM, et al. Signaling pathways of cell proliferation are involved in the differential effect of erythropoietin and its carbamylated derivative. *Biochim Biophys Acta.* 2013; 1833 (8): 1960–8. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2013.04.006.
53. Sturm B, Helminger M, Steinkellner H, et al. Carbamylated erythropoietin increases frataxin independent from the erythropoietin receptor. *Eur J Clin Invest.* 2010; 40 (6): 561-5. DOI: 10.1111/j.1365-2362.2010.02292.x.
54. Choi M, Ko SY, Lee IY, et al. Carbamylated erythropoietin promotes neurite outgrowth and neuronal spine formation in association with CBP/p300. *Biochem Biophys Res Commun.* 2014; 446 (1): 79–84.
55. Chattong S, Tanamai J, Kiatsomchai P, et al. Glutaraldehyde erythropoietin protects kidney in ischaemia/reperfusion injury

without increasing red blood cell production. *Br J Pharmacol.* 2013; 168 (1): 189–99. DOI: 10.1111/j.1476-5381.2012.02123.x

56. Sooklert K, S. Chattong S, Manotham K, et al. Cytoprotective effect of glutaraldehyde erythropoietin on HEK293 kidney cells after silver nanoparticle exposure. *Int. J. Nanomedicine.* 2016; 11: 597–605. DOI: 10.2147/IJN.S95654.

57. Orschell C, Plett A, M. Yamin M, et al. ARA 290 is an efficacious radiomitigator of both the hematopoietic and gastrointestinal syndromes of the acute radiation syndrome. Abstracts of the 55th Annual Meeting of the Radiation Research Society. 2009: 143.

58. Collino M, Thiemermann C, Cerami A, et al. Flipping the molecular switch for innate protection and repair of tissues: long-lasting effects of a non-erythropoietic small peptide engineered from erythropoietin. *Pharmacol Ther.* 2015; 151: 32–40.

59. Nagao M, Wen TC, Okamoto M. In vivo neuroprotective activity of epeptide ab against ischemic damage. *Cytotechnology.* 2005; (1-3): 139–44. DOI: 10.1007/s10616-005-3758-3.

60. Yoo SJ, Cho B, Moon C. Neuroprotective Effects of an Erythropoietin-Derived Peptide in PC1 2 Cells under Oxidative Stress. *CNS Neurol Disord Drug Targets.* 2016; 15 (8): 927–34.

61. Yoo SJ, Cho B, Lee D, et al. The erythropoietin-derived peptide MK-X and erythropoietin have neuroprotective effects against ischemic brain damage. *Cell Death Dis.* 2017; 17 (8): 3003. DOI: 10.1038/cddis.2017.381.

62. Pankratova S, Gu B, Kiryushko D, et al. A new agonist of the erythropoietin receptor, Epobis, induces neurite outgrowth and promotes neuronal survival. *J Neurochem.* 2012; 121 (6): 915-23. DOI: 10.1111/j.1471-4159.2012.07751.x.

63. Dmytriyeva O, Pankratova S, Korshunova I, et al. Epobis is a Nonerythropoietic and Neuroprotective Agonist of the Erythropoietin Receptor with Anti-Inflammatory and Memory Enhancing Effects. *Mediators Inflamm.* 2016; 2016: 1346390. DOI: 10.1155/2016/1346390.

64. Dmytriyeva O, Belmeguenai A, Bezin L, et al. Short erythropoietin-derived peptide enhances memory, improves long-term potentiation, and counteracts amyloid beta-induced pathology. *Neurobiol Aging.* 2019; 81: 88-101. DOI: 10.1016/j.neurobiolaging.2019.05.003.

65. Fu Z, Huang D, Cai J, et al. Expression changes of ERK1/2, STAT3 and SHP-2 in bone marrow cells from gamma-ray induced leukemia mice. *J Radiat Res.* 2006; 47 (2): 121-30. DOI: 10.1269/jrr.47.121.

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Иванов Игорь Михайлович, канд. мед. наук, заместитель начальника научно-исследовательского отдела Государственного научно-исследовательского испытательного института военной медицины Министерства обороны Российской Федерации, Санкт-Петербург, Россия; e-mail: gniiivm_15@mil.ru

Никифоров Александр Сергеевич, д-р биол. наук, ведущий научный сотрудник Государственного научно-исследовательского испытательного института военной медицины Министерства обороны Российской Федерации, Санкт-Петербург, Россия; e-mail: gniiivm_15@mil.ru

Венгерович Николай Григорьевич, д-р мед. наук, профессор кафедры промышленной экологии Санкт-Петербургского государственного химико-фармацевтического университета Министерства здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург, Россия; заместитель начальника научно-исследовательского отдела Государственного научно-исследовательского испытательного института военной медицины Министерства обороны Российской Федерации, Санкт-Петербург, Россия; e-mail: nikolai.vengerovich@pharminnotech.com

Перелыгин Владимир Вениаминович, д-р мед. наук, профессор, заведующий кафедрой промышленной экологии Санкт-Петербургского государственного химико-фармацевтического университета Министерства здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург, Россия; e-mail: vladimir.pereligin@pharminnotech.com

Прошина Юлия Александровна, научный сотрудник научно-исследовательского отдела Государственного научно-исследовательского испытательного института военной медицины Министерства обороны Российской Федерации, Санкт-Петербург, Россия; e-mail: gniiivm_15@mil.ru

ADDITIONAL INFORMATION ABOUT AUTHORS

Igor M. Ivanov, Ph.D. in Medicine, Deputy Head of Department State Research Institute of Military Medicine, Russian Federation of Ministry of Defense, Saint Petersburg, Russia; e-mail: gniiivm_15@mil.ru

Aleksandr S. Nikiforov, D.Sc. in Biology, Leading Researcher State Research Institute of Military Medicine, Russian Federation of Ministry of Defense, Saint Petersburg, Russia; e-mail: gniiivm_15@mil.ru

Nikolai G. Vengerovich, Doctor of Medicine (MD), Professor of the Industrial Ecology Department, Saint Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University, Saint-Petersburg, Russia; Deputy Head of Department State Research Institute of Military Medicine, Russian Federation of Ministry of Defense, Saint Petersburg, Russia; e-mail: nikolai.vengerovich@pharminnotech.com

Vladimir V. Perelygin, Doctor of Medicine (MD), Professor, Head of the Industrial Ecology Department, Saint Petersburg, Russia State Chemical and Pharmaceutical University, Saint-Petersburg, Russia; e-mail: vladimir.pereligin@pharminnotech.com

Ylia A. Proshina, Researcher, State Research Institute of Military Medicine, Russian Federation of Ministry of Defense, Saint Petersburg, Russia; e-mail: gniiivm_15@mil.ru

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

Pathogenic substantiation of application of erythropoietin modified forms and peptide analogues as cytotprotectors

©2020. I.M. Ivanov¹, A.S. Nikiforov¹, N.G. Vengerovich^{1,2*}, V.V. Perelygin², Y.A. Proshina¹

¹Institute of Military Medicine, Russian Federation of Ministry of Defense, Saint Petersburg, Russia

²Saint Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University, Saint Petersburg, Russia

* e-mail: nikolai.vengerovich@pharminnotech.com

Received December 01, 2019;

Revised January 05, 2020;

Accepted March 04, 2020

The article provides a review of the evidence from experimental and clinical studies on the blood-forming and non-blood-forming tissue-protective effects of erythropoietin. Information on its side effects (stimulation of tumor growth, autoimmune reactions, arterial hypertension, etc.) limiting the clinical use as a cytoprotector has been summarized. Well-known modifications of the erythropoietin molecule with a tissue-protective effect are considered, in particular, desialylated (asialoEPO), carboxylated (CEPO) and glutaraldehyde (GEPO) cytokine analogues.

The results of biomedical studies describing the tissue-protective effects of these compounds, as well as possible mechanisms of their receptor action, have been presented. The article discusses the main short-chain erythropoietin mimetics that reproduce individual active regions of cytokine amino acid sequence and contain from 11 to 25 amino acids: Helix B, ARA290, Eportis, Epopeptide-ab, MK-X, Epobis, NL100.

The biochemical mechanisms of cytoprotective action of erythropoietin and its derivatives have been considered, including binding to the heterodimeric receptor of non-blood-forming tissues and activation of intracellular signaling molecules possessing properties of apoptosis inhibitors.

It was noted that the tissue-protective effect of erythropoietin in vivo was observed in hemostimulating doses and was accompanied by side effects. At the same time, the use of modified forms of erythropoietin and its short-chain peptide analogues, which have a high affinity for the isoform of the erythropoietin receptor of non-blood-forming tissues and do not have hematopoietic properties allows to avoid the development of side effects and to reduce effective doses by 10-20 times.

KEYWORDS: erythropoietin; short-chain peptides; cytokine; ischemia; cytoprotection; alkylating agents; radiomimetic syndrome; free radicals