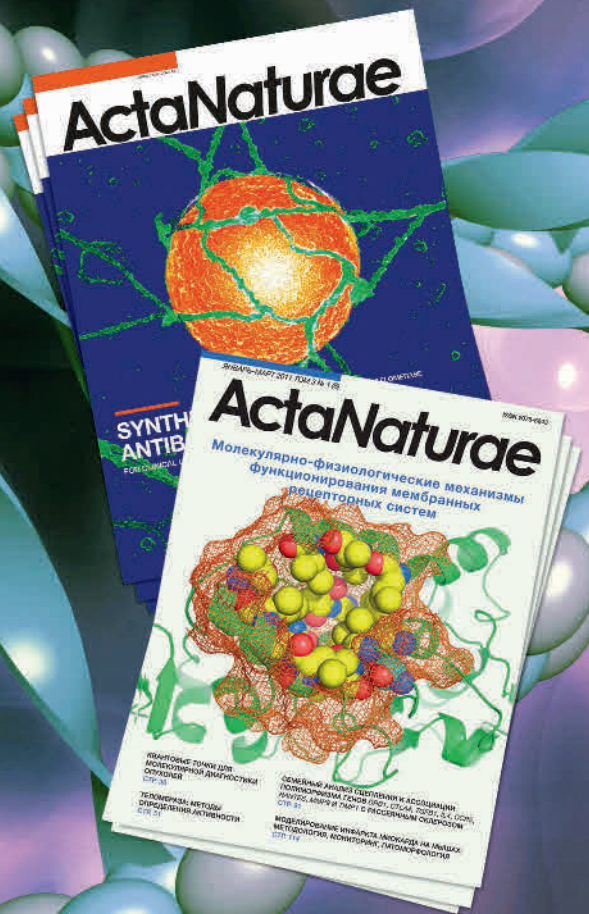


ПОДПИСКА НА ЖУРНАЛ

Acta Naturae

Журнал *Acta Naturae* уделяет особое внимание междисциплинарному характеру исследований и разработок, которые находятся на стыке различных сфер биологических специальностей - молекулярной биологии, биохимии, молекулярной генетики и биологической медицины.

Acta Naturae издается компанией «Парк-медиа» на русском и английском языках и входит в Перечень ведущих периодических изданий Высшей аттестационной комиссии Министерства образования и науки РФ и реферативную базу данных PubMed.



ПОДПИСКА В РЕДАКЦИИ:

119234, Москва, Ленинские горы, 1, владение 75Г
Телефон: +7 (495) 930-87-07, 930-88-51
Bio-Mail: podpiska@bioif.ru
Web site: www.actanaturae.ru

ПОДПИСКА ПО КАТАЛОГАМ НА ПОЧТЕ И ЧЕРЕЗ ИНТЕРНЕТ:

РОСПЕЧАТЬ
Индексы: 37283, 59881
www.pressa.rossp.ru

ИНФОРМНАУКА
Индекс: 59881
www.informnauka.com

ИНТЕР-ПОЧТА
Индекс: 17510
www.interpochta.ru

ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ АВТОРОВ:

Если Вы хотите опубликовать свою работу в журнале *Acta Naturae*, пишите на journal@bioif.ru и звоните по телефону: 8 (495) 930-87-07



УДК 57.021.6:615.214.2

Молекулярный механизм действия Ноопепта – замещенного Pro-Gly-дипептида

Ю. В. Вахитова^{1,2*}, С. В. Садовников², С. С. Борисевич^{2,3}, Р. У. Островская¹, Т. А. Гудашева¹, С. Б. Середенин¹

¹Научно-исследовательский институт фармакологии им. В.В. Закусова, 125315, Москва, ул. Балтийская, 8

²Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра РАН, 450065, Уфа, просп. Октября, 71

³Уфимский институт химии РАН, 450065, Уфа, просп. Октября, 71

*E-mail: juvv73@gmail.com

Поступила в редакцию 16.06.2015

Принята к печати 10.09.2015

РЕФЕРАТ Изучено влияние Ноопепта (этиловый эфир N-фенилацетил-L-пролилглицина) на ДНК-связывающую активность транскрипционных факторов (ТФ) в клетках линии НЕК293, транзистентно трансфицированных люциферазными репортерными конструкциями, содержащими сайты связывания ТФ: CREB, NFAT, NF-κB, p53, STAT1, GAS, VDR, HSF1 и HIF-1. Показано, что Ноопепт (10 мкМ) увеличивал ДНК-связывающую активность только HIF-1 и не влиял на активность CREB, NFAT, NF-κB, p53, STAT1, GAS, VDR и HSF1. Выраженность HIF-позитивного эффекта Ноопепта зависела от его концентрации. В условиях стабилизации HIF-1, вызванной индуктором гипоксии CoCl₂, Ноопепт обеспечивал дополнительное повышение ДНК-связывающей активности HIF-1. Пирацетам (1 мМ) не вызывал значимых изменений ДНК-связывающей активности ТФ. Результаты молекулярного докинга показали, что Ноопепт (L-изомер), а также метаболит Ноопепта – L-изомер N-фенилацетилпролина – способны связываться с активным сайтом пролилгидроксилазы 2. Данные о вызываемом Ноопептом селективном увеличении ДНК-связывающей активности HIF-1 с учетом функциональной значимости генов, активируемых этим фактором транскрипции, объясняют выявленные ранее нейрохимические и фармакологические эффекты Ноопепта, что дает основание рассматривать HIF-позитивный эффект в качестве первичного механизма действия этого дипептида.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА гипоксия, докинг, нейропротекция, Ноопепт, пролилгидроксилаза, транскрипционный фактор HIF-1.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ CREB – белок, связывающий cAMP-зависимый элемент (cAMP-responsive element-binding protein); NFAT – ядерный фактор активированных T-клеток (nuclear factor of activated T-cells); NF-κB – транскрипционный фактор (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells); STAT1 – фактор транскрипции, преобразователь сигналов и активатор транскрипции (signal transducer and activator of transcription); GAS – последовательность, активируемая интерфероном γ (interferon-gamma-activated sequence); VDR – рецептор витамина D (vitamin D3 receptor); HSF1 – транскрипционный фактор, регулирующий синтез белков теплового шока (heat shock transcriptional factor 1); HIF-1 – фактор, индуцируемый гипоксией (hypoxia-inducible factor 1).

ВВЕДЕНИЕ

Ноопепт (этиловый эфир N-фенилацетил-L-пролилглицина) разработан в качестве лекарственного средства в НИИ фармакологии им. В.В. Закусова. Синтез препарата основан на оригинальной гипотезе пептидного дизайна, согласно которой с использованием соответствующих аминокислот воспроизводятся структуры, близкие к известным психотропным средствам [1]. Непептидным про-

образом Ноопепта был ноотропный препарат Пирацетам. Фармакологическая активность нового соединения оказалась в целом сходной с активностью Пирацетама, однако она проявлялась в дозах в 1000 раз более низких [2, 3]. Кроме того, у Ноопепта более выражены анксиолитические [4] и нейропротективные свойства [5–7].

Клиническое изучение Ноопепта (ЛС 015770) подтвердило обнаруженные в эксперименте его ноотроп-

ные эффекты. У больных с мягкими когнитивными нарушениями цереброваскулярного и посттравматического генеза препарат ослаблял когнитивные нарушения, проявлял анксиолитическое и вегетостабилизирующее действие (www.noopept.ru).

Механизм действия Ноопепта изучается со времени его синтеза. Установлено, что препарат усиливает экспрессию NGF и BDNF в гиппокампе [8], проявляет холино-позитивные свойства на поведенческом и нейрональном уровне [9], ослабляет окислительный стресс и усиливает активность антиоксидантных систем [7, 10], вызывает угнетение индуцируемых стрессом киназ pSAPK/JNK и pERK1 [11]. Однако изучение первичных взаимодействий Ноопепта более чем со 100 известными рецепторными образованиями, выполненное согласно нашему протоколу компанией CEREP (Франция), не привело к ожидаемому выявлению первичных мишеней. Вместе с тем, обнаруженный широкий спектр нейрохимических и фармакологических эффектов Ноопепта определил необходимость дальнейшего поиска его мишеней.

С целью получения более полной информации о мишенях Ноопепта мы проанализировали *in vitro* влияние препарата на ДНК-связывающую активность фармакологически значимых биомишеней – транскрипционных факторов (ТФ) CREB, NFAT, NF-κB, p53, STAT1, GAS, VDR, HSF1, HIF-1. Выявив избирательное влияние Ноопепта на HIF-1, мы изучили эффект препарата на активность этого транскрипционного фактора в условиях моделируемой гипоксии *in vitro*.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Культивирование клеток

В работе использовали клетки линии НЕК293 (перевиваемые клетки почки эмбриона человека; Российская коллекция клеточных культур, Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург). Клетки культивировали при 37°C, 5% CO₂ в среде DMEM («Биолот», Россия), содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки (Sigma, США), 2 мМ L-глутамин, 50 мкг/мл гентамицина сульфата, 2,5 мкг/мл амфотерицина В («ПанЭко», Россия).

Влияние Ноопепта на ДНК-связывающую активность транскрипционных факторов изучали с использованием люциферазных репортерных конструкций, содержащих сайты связывания CREB, NFAT, NF-κB, p53, STAT1, GAS, VDR, HSF1 и HIF-1 в соответствии с [12].

Для проведения трансфекций клетки линии НЕК293 рассаживали по 4 × 10³ клеток в лунки 96-луночных планшетов в 100 мкл среды DMEM

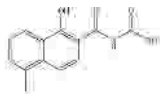
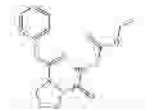
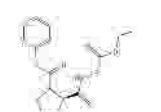
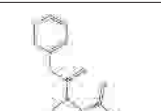
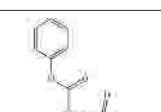
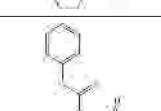
без антибиотика, содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки, 2 мМ L-глутамин. Репортерные векторные конструкции, содержащие сайты связывания транскрипционных факторов CREB, NFAT, NF-κB, p53, STAT1, GAS, VDR, HSF1 и HIF-1, получены на основе плазмидного вектора pTL-Luc (Panomics, США; несет ген люциферазы *Photinus pyralis*) [13]. Клетки НЕК293 транзитивно трансфицировали данными конструкциями с помощью реагента Липофектамин 2000 (Invitrogen, США) согласно рекомендациям изготовителя. Через 6 ч после трансфекции среду заменяли средой с антибиотиком (DMEM, 10% эмбриональной телячьей сыворотки, 2 мМ L-глутамин, 50 мкг/мл гентамицина сульфата) и через 18 ч добавляли изучаемые препараты (Ноопепт, 10 мкМ; Пирацетам, 1 мМ). Клетки инкубировали в присутствии Ноопепта или Пирацетама в течение еще 24 ч. Люциферазную активность в клеточных лизатах определяли с помощью набора Dual Luciferase Reporter Assay System (Promega, США) на планшетном анализаторе 2300 EnSpire® Multimode Plate Reader (Perkin Elmer, США). В качестве внутреннего контроля трансфекции применяли котрансфекцию с плазмидой pRL-TK (Promega, США), кодирующей ген люциферазы *Renilla reniformis*. Значения люминесценции *P. pyralis* нормировали по люминесценции *R. reniformis* в каждом измерении.

Экспериментальное моделирование гипоксии осуществляли с использованием CoCl₂, который вызывает стабилизацию HIF-1, т.е. является фармакологическим индуктором гипоксии [14]. Люциферазная конструкция для анализа активности HIF-1 содержит четыре копии консенсусной последовательности 5'-ACGTG-3' – сайта связывания белка HIF-1 (конструкция HIF-1-Luc). Клетки, трансфицированные плазмидным вектором HIF-1-Luc, предварительно инкубировали с Ноопептом в течение 8 ч (конечные концентрации 1, 10, 100 мкМ; двукратное внесение через каждые 4 ч), далее вносили индуктор гипоксии CoCl₂ в рабочей концентрации 50 мкМ и продолжали совместную инкубацию Ноопепта и CoCl₂ в течение 16 ч, после чего люциферазную активность определяли как описано выше.

Статистический анализ

Среднее арифметическое значений, полученных по двум повторам в трех независимых экспериментах, и стандартную ошибку среднего рассчитывали с помощью программы Statistica 6.1 (StatSoft, Inc., США). Экспериментальные группы сравнивали с использованием парного *t*-критерия Стьюдента для зависимых выборок.

In silico оценка энергий взаимодействия лиганда и рецептора

Код лиганда	Структура лиганда	$\Delta G_{\text{FlexX}}^1$ кДж/моль ¹	RMSD ²	ΔG_{HYDE}^3 кДж/моль ³	LE ⁴
ZINC24800213		-31.8	0.42	-63	0.79 (B)
ZINC1542824_L		-17.0	0.48	-44	0.45 (CB)
ZINC3812682_D		-17.5	1.10	-42	0.42 (CB)
ZINC76075_L		-24.1	0.47	-38	0.53 (B)
PA2_L		-27.2	0.55	-49	0.55 (B)
PA2_D		-28.2	0.73	-41	0.47 (CB)

¹ ΔG_{FlexX} – свободная энергия связывания, кДж/моль.

² RMSD – среднеквадратичное отклонение положения лиганда в активном сайте.

³ ΔG_{HYDE} – энергия сродства лиганда с сайтом связывания, кДж/моль.

⁴ LE – эффективность лиганда ($LE = |\Delta G_{\text{HYDE}}|/N$ [22, 23], где N – количество тяжелых, т.е. не водородных атомов), при этом эффективность лиганда может быть оценена, как В – высокая эффективность, СВ – эффективность выше средней [22].

Молекулярный докинг

Для построения и валидации модели докинга использовали данные о трехмерной структуре белка-мишени – пролилгидроксилазы 2 (PHD2; hypoxia-inducible factor-*L*-proline, 2-oxoglutarate:oxygen oxidoreductase [КФ 1.14.11.29]; код PDB: 2G19) – в комплексе с «нативным» ингибитором (код ZINC: 24800213; IC₅₀ 1.4 мкМ) [15, 16]. В качестве лигандов рассматривали: Ноопепт и его *D*-энантиомер (коды ZINC: 1542824 и 3812682 соответственно); метаболит Ноопепта *L*-*N*-фенилацетилпролин (код ZINC: 76075), а также стереоизомеры описанного ранее [31] ингибитора пролилгидроксилазы (шифры PA2L

и PA2D) (таблица). Геометрические параметры большинства молекул извлечены из базы данных ZINC [17] или смоделированы с помощью программы ChemCraft v1.7 [18] и оптимизированы методом HF/6-311G(d,p) в программе GAUSSIAN 09 C.01 [19]. Подготовка структур мишени и лигандов к докингу, как и все процедуры докинга, проведены с помощью программы LeadIT 2.1.8 [20]. Все квантово-химические расчеты проведены на кластерном суперкомпьютере Уфимского института химии РАН.

Область окружения «нативного» ингибитора (ZINC: 24800213) соседними аминокислотными остатками составляет 6.5 Å и содержит Arg383, Tyr310,

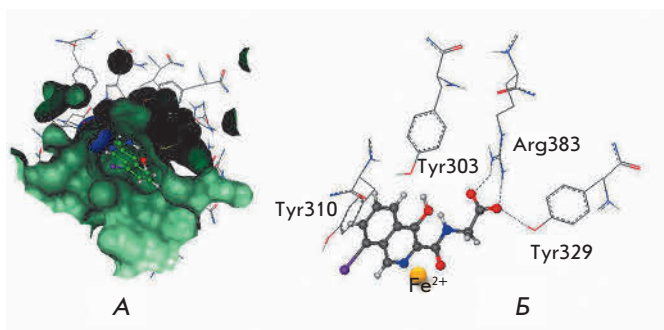


Рис. 1. Анализ активного сайта фермента пролилгидролазы 2. А – активный центр, занятый «нативным» лигандом. Б – взаимодействие ингибитора с аминокислотными остатками фермента (докинг-решение)

Tyr303 и Fe²⁺. Анализ активного центра фермента 2G19 показал, что Arg383 и Tyr329 образуют водородные связи с карбоксильной группой «нативного» ингибитора ZINC 24800213; Tyr310 и Tyr303 формируют π-π-электронное взаимодействие с ароматическими кольцами этого лиганда. Аминокислотные остатки Trp389, Trp258, Met299 и Ile256 образуют гидрофобный карман (рис. 1). При подготовке структуры фермента к процедуре докинга из активного центра удалили все молекулы воды. Редокинг «нативного» лиганда в активный сайт фермента PHD2 точно воспроизводит способ связывания лиганда и фермента, определенный кристаллографически. Среднеквадратичное отклонение составляет 0.44 Å. Подпрограмма FlexX [21] позволяет провести проце-

дуру докинга лигандов (таблица) и оценить энергию связывания лиганда и рецептора в активном сайте. Количество докинг-решений может быть большим, и выбор оптимального решения основывается на минимальном значении энергии связывания в совокупности с минимальным значением среднеквадратичного отклонения (RMSD) позиции лиганда в сайте связывания. Далее выбранная позиция подвергается еще одному этапу расчета: оценке энергии сродства лиганда с сайтом связывания (ΔG_{HYDE} , кДж/моль) и оценке эффективности лиганда [22, 23]. Подробный алгоритм расчета описан в работе [22]. Отмечается, что оптимальным является использование двух последовательных этапов выбора соединения-лидера среди лигандов.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Данные, представленные на рис. 2А, свидетельствуют о том, что инкубация с Ноопептом в концентрации 10 мкМ в течение 24 ч увеличивала ДНК-связывающую активность HIF-1 на 43% и не вызывала статистически значимых изменений ДНК-связывающей активности факторов CREB, NFAT, NF-κB, p53, STAT1, GAS, VDR и HSF1. Как следует из данных, представленных на рис. 3, Ноопепт в концентрации 10 и 100 мкМ увеличивал уровень индукции люциферазы. С использованием препарата сравнения показано, что Пирацетам ни в эквимолярной (10 мкМ, данные не представлены), ни в более высокой концентрации (1 мМ) не вызывает статистически значимых изменений ДНК-связывающей активности изученных транскрипционных факторов (рис. 2Б).

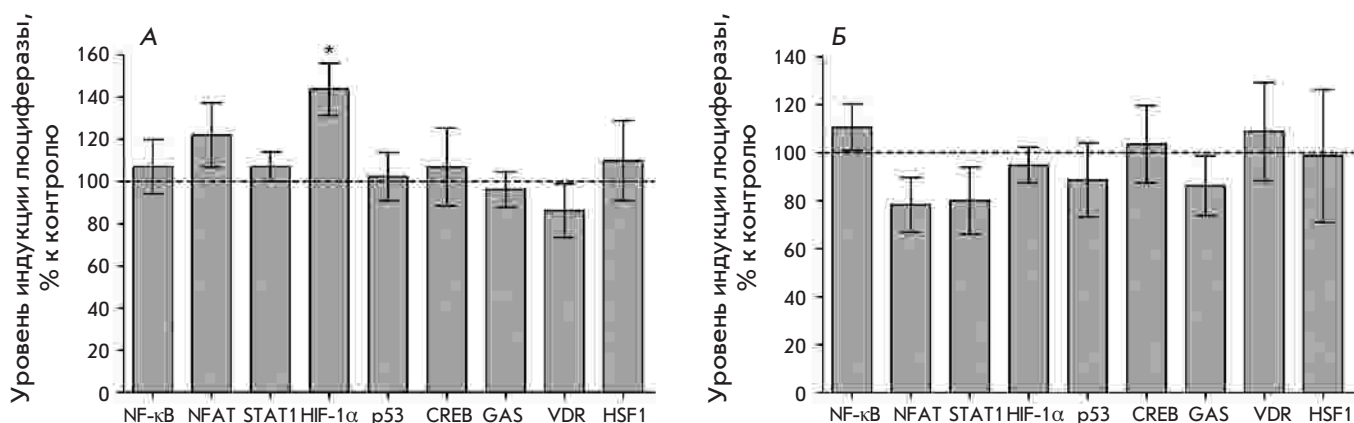


Рис. 2. Влияние Ноопепта, 10 мкМ (А) и Пирацетама, 1 мМ (Б) на базальную ДНК-связывающую активность транскрипционных факторов NF-κB, NFAT, STAT1, HIF-1, p53, CREB, GAS, VDR, HSF1 *in vitro*. Статистическую значимость различий оценивали с помощью парного *t*-критерия Стьюдента для зависимых выборок ($n = 3$, * $p < 0.05$)

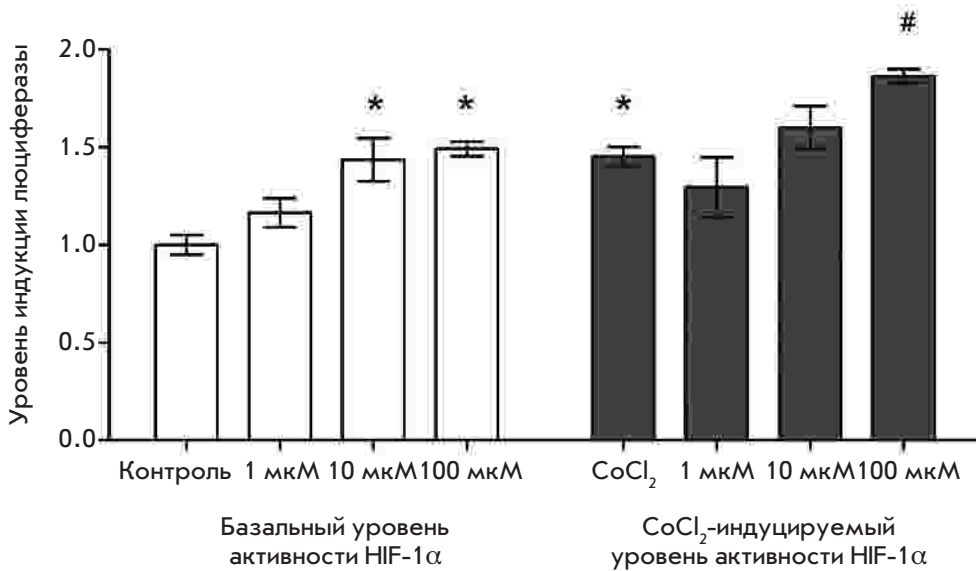


Рис. 3. Влияние Ноопепта на базальную и индуцированную активность HIF-1. Группа «контроль» – значения базальной активности HIF-1 в нестимулированных клетках; группа «CoCl₂» – значения активности HIF-1 в CoCl₂-стимулированных клетках. Данные представлены в виде среднего арифметического ± стандартная ошибка среднего (n = 3; *p < 0.05 по отношению к группе «контроль»; #p < 0.05 по отношению к группе «CoCl₂»)

На следующем этапе работы анализировали влияние Ноопепта на ДНК-связывающую активность HIF-1 в присутствии фармакологического миметика гипоксии CoCl₂. В полном соответствии с опубликованными данными на фоне действия CoCl₂ наблюдали повышение активности HIF-1. Добавление Ноопепта в концентрации 10 и 100 мкМ приводило к дополнительному увеличению HIF-1-зависимой люциферазной активности (рис. 3). Таким образом, впервые установлено, что Ноопепт обладает способностью увеличивать как базальную, так и индуцированную фармакологическим миметиком гипоксии активность HIF-1 *in vitro*.

Фактор, индуцируемый гипоксией (HIF-1), является гетеродимером, состоящим из двух субъединиц – чувствительной к кислороду субъединицы HIF-1α и конститутивно экспрессирующейся HIF-1β. Гипоксия способствует возрастанию уровня HIF-1α, его димеризации с HIF-1β, мобилизации коактиваторов (p300/CBP) и связыванию этого комплекса с элементом HRE (hypoxia-response element) в регуляторных областях генов-мишеней. В нормоксических условиях зависимое от кислорода гидроксигидроксилирование остатков пролина в молекуле HIF-1α пролилгидроксилазами необходимо для связывания компонентом убиквитин-протеин-лигазы E3 – белком Гипшеля–Линдау (VHL). Убиквитинилированный HIF-1α становится мишенью для деградации 26S протеасомами. В присутствии кислорода остаток аспарагина в C-концевом транскрипторном домене (C-TAD) HIF-1α гидроксигидроксилируется аспарагингидроксилазой (FIH1, factor inhibiting HIF-1), что блокирует

его взаимодействие с коактиватором транскрипции p300/CBP. Таким образом, при нормоксии PHD и FIH инактивируют HIF-1α, подавляя зависимую от HIF-1 экспрессию генов-мишеней. В условиях гипоксии активность PHD и FIH снижается, что приводит к уменьшению деградации HIF-1α и запуску транскрипции зависимых от него генов [24]. Показано [25], что HIF-1 активирует в общей сложности до 100 генов. На рис. 4 представлены основные мишени HIF-1, к числу которых относятся гены, вовлеченные в процессы ангиогенеза за счет активации фактора роста эндотелия сосудов, усиления синтеза эритропоэтина, активации систем транспорта глюкозы через мембраны, цитопroteкции нейротрофическими факторами, нормализации клеточного цикла и метаболизма на уровне митохондрий, в том числе активности антиоксидантных ферментов – супероксиддисмутазы и каталазы. Совокупность этих эффектов обеспечивает осуществление адаптивной реакции на гипоксическое воздействие. Наряду с этим HIF-1 влияет на состояние многих нейротрансмиттерных систем – он активирует белок, контролирующий рецепторы ГАМК (GABARBP) [26], повышает активность тирозингидроксилазы [27]. Описаны тесные взаимоотношения HIF-1 с холинорецепторами [28].

Как показано в нашей работе, Ноопепт вызывает зависимое от концентрации увеличение базальной ДНК-связывающей активности HIF-1. При стабилизации HIF-1 с помощью CoCl₂, химического индуктора этого транскрипционного фактора [29, 30], Ноопепт обеспечивает дополнительное нарастание ДНК-связывающей активности HIF-1. Эффект в от-

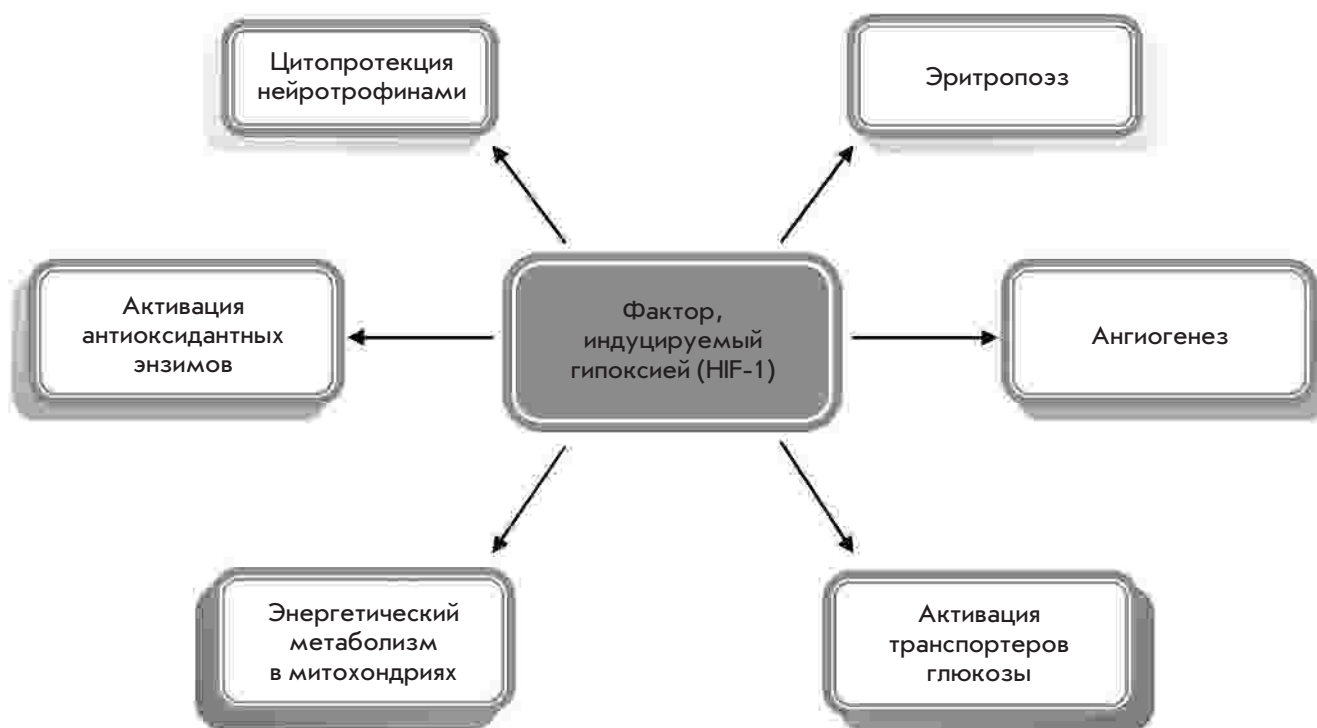


Рис. 4. Фактор, индуцируемый гипоксией HIF-1, и его мишени. Модифицировано по [35]

ношении HIF-1 специфичен для Ноопепта: классический ноотропный препарат Пирацетам не влияет на активность данного транскрипционного фактора. Ноопепт увеличивает ДНК-связывающую активность только HIF-1, тогда как активность других транскрипционных факторов (CREB, NFAT, NF-κB, p53, STAT1, GAS, VDR и HSF1) не повышается. Поскольку пролилгидроксилаза непосредственно участвует в деактивации HIF-1, а аналоги пролина описаны как эффективные ингибиторы этого фермента [31], можно предположить, что увеличение ДНК-связывающей активности HIF-1 при действии Ноопепта связано с ингибированием этого фермента.

Сопоставление структуры ингибиторов пролилгидроксилазы, представленных в работе Ма и соавт. [31], и метаболитов Ноопепта позволяет сделать вывод о сходстве соединения PA2 (бензилоксикарбонилпролин) с N-концевым фрагментом молекулы Ноопепта – N-фенилацетилпролином (таблица) [32, 33]. Следует принять во внимание, что диапазон концентраций, в которых PA2 угнетает пролилгидроксилазу ($K_i = 2.38 \text{ мкМ}$, $EC_{50} = 3.17 \text{ мкМ}$) [31], близок к выявленному нами уровню эффективных концентраций для Ноопепта.

Согласно результатам молекулярного докинга Ноопепт и L-изомер N-фенилацетилпролина связываются с активным центром пролилгидроксилазы

с эффективностью, сопоставимой с эффективностью L-изомера PA2L (таблица). Качественная оценка эффективности лиганда оценивается как высокая. L-стереоизомер N-фенилацетилпролина в активном сайте фермента формирует водородные связи с Arg383 и Tyr329, а молекула PA2L координируется атомами кислорода вокруг атома железа (рис. 5). Интересно отметить, что фармакологически неактивный D-изомер Ноопепта имеет более низкую энергию связывания. Таким образом, можно предположить, что Ноопепт и его метаболит – L-изомер N-фенилацетилпролина, могут связываться с активным сайтом пролилгидроксилазы 2 и, возможно, ингибировать ее ферментативную активность. Очевидно, что для окончательного заключения требуется экспериментальное изучение действия Ноопепта и его метаболита на активность пролилгидроксилазы. Дополнительного изучения также требует возможное взаимодействие Ноопепта с аспарагингидроксилазой.

Возвращаясь к вопросу о взаимодействии Ноопепта с HIF-1 (при отсутствии такого взаимодействия у Пирацетама), следует отметить, что Ноопепт сконструирован в качестве дипептидного аналога Пирацетама. Однако эффективные дозы Ноопепта на три порядка меньше, чем у Пирацетама [2]. Новый препарат и его непептидный

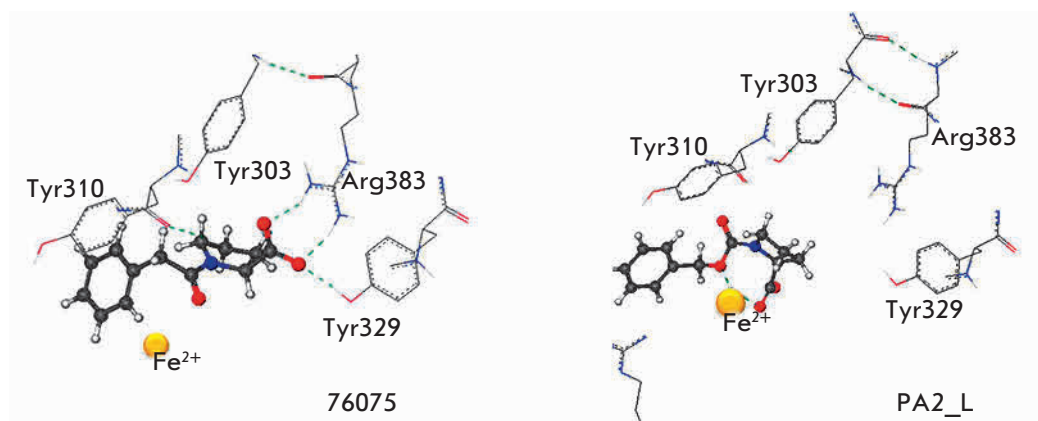


Рис. 5. Результаты молекулярного докинга: расположение лигандов в активном сайте пролилгидроксилазы (водородные связи показаны пунктирной линией)

прообраз различаются и по спектру фармакологической активности. Так, Ноопепт облегчал все фазы процессинга информации, а Пирацетам влиял преимущественно на начальные фазы [1]. Ноопепт проявляет выраженные нейропротективные свойства, тогда как у Пирацетама они, в зависимости от оцениваемого показателя, либо слабо выражены [7, 34], либо отсутствуют [35]. С фармакологических позиций такие различия должны иметь в своей основе особенности механизма действия, к которым можно отнести обнаруженный нами эффект взаимодействия Ноопепта с HIF-1.

Независимо от деталей указанного взаимодействия важно, что этот пролинсодержащий дипептид повышает активность HIF-1. Известно, что активация системы HIF рассматривается в настоящее время как один из основных механизмов нейропротекции при гипоксии, ишемии мозга, нейродегенеративных заболеваниях [24, 36]. В ходе многолетнего изучения именно эти состояния определили в качестве фармакологических мишеней действия Ноопепта на широком наборе соответствующих экспериментальных моделей.

Вслед за способностью Ноопепта повышать выживаемость животных в условиях гипербарической гипоксии [37], выявленной в самом начале изучения этого дипептида, было показано, что он уменьшает величину очага ишемического повреждения мозга на моделях циркуляторной гипоксии, например, кортикального фотоиндуцированного тромбоза [6] и перевязки среднелобной артерии [5]. Способность Ноопепта ослаблять выраженность окислительного стресса установлена как на нейрональных культурах различного типа: зернистых клетках мозжечка [35], культуре кортикальных нейронов абортинированных плодов с диагностированным синдромом Дауна [7], культуре PC12 [38] и культуре SH-SY5Y [39], так и в условиях целого организма в эксперименте на мозговой ткани и плазме крови крыс [40].

Способность усиливать активность супероксиддисмутазы и каталазы показана как в эксперименте [10], так и в клинических условиях [34].

На моделях болезни Альцгеймера выявлена способность Ноопепта не только устранять проявления когнитивного дефицита [41], но и оказывать нейропротективное действие, приводящее к ослаблению нарушений окислительных процессов и кальциевого гомеостаза, усилению нейрогенеза, предупреждению агрегации тау-белков, вызванной фрагментом β -амилоида₂₅₋₃₅ [38], устранению дефицита NGF и BDNF на фоне введения в желудочки мозга диабетогенного токсина стрептозотоцина [42]. Ноопепт способен уменьшать цитотоксический эффект агрегированного α -синуклеина на клеточной модели паркинсонизма [39]. Все эти многочисленные эффекты могут быть объяснены активацией транскрипционного фактора HIF-1.

За последние годы нами показано, что Ноопепт оказывает антидиабетическое действие на модели стрептозотоцинового диабета [43]. Этот факт трактовался нами как результат многофакторного метаболического действия препарата – ослабления свойственного диабету дефицита антиоксидантных систем и нейротрофических факторов, усиленной продукции провоспалительных цитокинов [44]. Полученные в настоящей работе результаты привлекли наше внимание к данным о роли HIF-1 в развитии патологических процессов при сахарном диабете. Так, сообщается о способности инсулина нарушать образование HIF-1 и о роли дефицита этого фактора в развитии сахарного диабета типа 1 и 2, а также его осложнений [45]. Нарушение функции систем транспорта глюкозы GLUT1 и GLUT3 через клеточные барьеры, наблюдаемое при дефиците HIF-1, способствует развитию резистентности к инсулину как при болезни Альцгеймера, так и при сахарном диабете [46]. Доказано участие HIF-1 в экспрессии инкретинных – важнейших факторов цитопротекции

β-клеток поджелудочной железы [47]. Совокупность этих данных позволяет предположить, что в реализации антидиабетического эффекта Ноопепта, в том числе в выявленной нами недавно способности этого препарата повышать уровень инкретина – глюкагоноподобного пептида-1 (ГПП-1) [44], участвует его HIF-1-позитивный эффект.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные в настоящей работе данные о способности эффективного ноотропного и нейропротективного препарата Ноопепт вызывать увеличение ДНК-связывающей активности HIF-1 позволяют по-новому трактовать широкий спектр его действия, а именно, считать, что HIF-1-позитивный эффект препарата можно рассматривать как первичный механизм его действия. Уточнение молекулярных механизмов, лежащих в основе HIF-1-позитивного действия Ноопепта, безусловно, требует дальнейшего исследования, но наличие этого эффекта, несомнен-

но, имеет важное значение, поскольку позволяет объяснить практически все известные на сегодняшний день эффекты Ноопепта и, возможно, других биологически активных Pro-Gly-пептидов. Эти данные предоставляют дополнительные доказательства в пользу современных представлений о важной роли компонентов HIF-1-зависимого сигнального пути и запускаемых этим транскрипционным фактором компенсационных процессов в механизмах нейропротекции. ●

Исследования выполнены с использованием оборудования ЦКП «Биомика» (Отделение биохимических методов исследований и нанобиотехнологии РЦКП «Агидель», Уфа) и УНУ «КОДИНК».

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Президента РФ для ведущих научных школ (НШ 5923.2014.4).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Гудашева Т.А. // Вестн. РАМН. 2011. № 7. С. 8–16.
- Seredenin S.B., Voronina T.A., Gudasheva T.A., Ostrovskaya R.U., Rozantsev G.G., Skoldinov A.P., Trofimov S.S., Halikas J., Garibova T.L. Biologically active N-acylprolyldipeptides having antiamnesic, antihypoxic effects. Patent 5.439.930 USA. 1995.
- Gudasheva T.A., Voronina T.A., Ostrovskaya R.U., Rozantsev G.G., Vasilevich N.I., Trofimov S.S., Kravchenko E.V., Skoldinov A.P., Seredenin S.B. // Eur. J. Med. Chem. 1996. V. 31. P. 151–157.
- Ostrovskaya R.U., Seredenin S.B., Voronina T.A., Molodavkin G.M., Gudasheva T.A. // In Animal models in biological psychiatry / Ed. Kalueff A.V. N.-Y.: Nova Sci. Publ. Inc., 2006. P. 165–182.
- Гаврилова С.А., Ус К.С., Островская Р.У., Кошелев В.Б. // Эксп. клин. фармакология. 2006. Т. 69. № 4. С. 16–18.
- Ostrovskaya R.U., Romanova G.A., Barskov I.V., Shanina E.V., Gudasheva T.A., Victorov I.V., Voronina T.A., Seredenin S.B. // Behav. Pharmacol. 1999. V. 10. P. 549–553.
- Pealsman A., Hoyo-Vadillo C., Seredenin S.B., Gudasheva T.A., Ostrovskaya R.U., Busciglio J. // Int. J. Dev. Neurosci. 2003. V. 21. P. 117–124.
- Островская Р.У., Гудашева Т.А., Цаплина А.П., Вахитова Ю.В., Салимгареева М.Х., Ямиданов Р.С., Середенин С.Б. // Бюл. эксп. биол. и мед. 2008. Т. 146. № 9. С. 309–312.
- Островская Р.У., Мирзоев Т.Х., Фирова Ф.А., Трофимов С.С., Гудашева Т.А., Греченко Т.Н., Гутырчик Е.Ф., Баркова Е.Б. // Эксп. клин. фармакология. 2001. Т. 64. № 2. С. 11–14.
- Менджеридский А.М., Лысенко А.В., Демьяненко С.В., Прокофьев В.Н., Гудашева Т.А., Островская Р.У. // Нейрохимия. 2003. Т. 20. № 4. С. 281–286.
- Островская Р.У., Вахитова Ю.В., Салимгареева М.Х., Ямиданов Р.С., Садовников С.В., Капица И.Г., Середенин С.Б. // Эксп. клин. фармакология. 2010. Т. 73. № 12. С. 2–5.
- Phippard D., Manning A.M. // Methods Mol. Biol. 2003. V. 225. P. 19–23.
- Салимгареева М.Х., Садовников С.В., Фарафонтон Е.И., Зайнуллина Л.Ф., Вахитов В.А., Вахитова Ю.В. // Прикладная биохимия и микробиология. 2014. Т. 50. № 2. С. 219–225.
- Piret J.P., Mottet D., Raes M., Michiels C. // Ann. N.Y. Acad. Sci. 2002. V. 973. P. 443–447.
- Rose P.W., Prlić A., Bi C., Bluhm W.F., Christie C.H., Dutta S., Green R.K., Goodsell D.S., Westbrook J.D., Woo J., et al. // Nucl. Acids Res. 2015. V. 43. P. 345–356. <http://www.rcsb.org/>
- McDonough M.A., Li V., Flashman E., Chowdhury R., Mohr C., Liénard B.M., Zondlo J., Oldham N.J., Clifton I.J., Lewis J., et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2006. V. 103. № 26. P. 9814–9819.
- Irwin J.J., Shoichet B.K. // J. Chem. Inform. Model. 2005. V. 45. P. 177–182.
- Zhurko G.A., Zhurko D.A. // ChemCraft. v. 1.7. 2013.
- Frisch M.J., Trucks G.W., Schlegel H.B., Scuseria G.E., Robb M.A., Cheeseman J.R., Scalmani G., Barone V., Mennucci B., Petersson G.A., et al. // Gaussian 09, Revision C.01, Gaussian Inc., Wallingford CT, 2010.
- Claussen H., Dramburg I., Gastreich M., Hindle S., Kaemper A., Kramer B., Lilienthal M., Mueller G., Rarey M., Wefing S., et al. // LeadIT. V. 2.1.8 BioSolveIT CmbH, 2014.
- Rarey M., Kramer B., Lengauer T., Klebe G. // J. Mol. Biol. 1996. V. 261. P. 470–489.
- Schneider N., Hindle S., Lange G., Klein R., Albrecht J., Briem H., Beyer K., Claußen H., Gastreich M., Lemmen Ch., Rarey M. // J. Comput Aided Mol. Des. 2012. V. 26. P. 701–723.
- Kuntz I.D., Chen K., Sharp K.A., Kollman P.A. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1999. V. 96. № 18. P. 9997–10002.
- Semenza G. // Cell. 2012. V. 148. № 3. P. 399–408.
- Zheng H., Fridkin M., Youdim M. // Persp. Med. Chem. 2015. V. 7. P. 1–8.
- Park S.H., Kim B.R., Lee J.H., Park S.T., Lee S.H., Dong S.M., Rho S.B. // Cell Signal. 2014. V. 26. № 7. P. 1506–1513.
- Schnell P.O., Ignacak M.L., Bauer A.L., Striet J.B., Paulding W.R., Czyzyk-Krzeska M.F. // J. Neurochem. 2003. V. 85. № 2. P. 483–491.

28. Hirota K., Ryo Fukuda R., Takabuchi S., Kizaka-Kondoh S., Adachi T., Kazuhiko Fukuda K., Semenza G.L. // *J. Biol. Chem.* 2004. V. 279. № 40. P. 41521–41528.
29. Epstein A.C., Gleadle J.M., McNeill L.A., Hewitson K.S., O'Rourke J., Mole D.R., Mukherji M., Metzen E., Wilson M.I., Dhanda A., et al. // *Cell.* 2001. V. 107. № 1. P. 43–54.
30. Yuan Y., Hilliard G., Ferguson T., Millhorn D.E. // *J. Biol. Chem.* 2003. V. 278. № 18. P. 15911–15916.
31. Ma X., Wang X., Cao J., Geng Z., Wang Z. // *PLoS One.* 2014. V. 9. № 4. e95692.
32. Бойко С.С., Жердев В.П., Дворянинов А.А., Гудашева Т.А., Островская Р.У., Воронина Т.А., Розанцев Г.Г., Середенин С.Б. // *Эксп. клин. фармакология.* 1997. Т. 60. № 2. С. 101–104.
33. Gudasheva T.A., Boyko S.S., Akrapov V.Kh., Ostrovskaya R.U., Skoldinov S.P., Rozantsev G.G., Voronina T.A., Zherdev V.P., Seredenin S.B. // *FEBS Lett.* 1996. V. 391. P. 149–151.
34. Федорова Т.Н., Ус К.С., Островская Р.У. // *Нейрохимия.* 2007. Т. 24. № 1. С. 69–73.
35. Андреева Н.А., Стемальшук Е.В., Исаев Н.К., Островская Р.У., Гудашева Т.А., Викторов И.В. // *Бюл. эксп. биол. и мед.* 2000. Т. 130. № 10. С. 418–421.
36. Zhang Z., Yan J., Chang Y., ShiDu Yan S., Shi H. // *Curr. Med. Chem.* 2011. V. 18. № 28. P. 4335–4343.
37. Фирова Ф.А. Спектр нейротропной активности оригинального замещенного пролил-дипептида ГВС-111: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. М.: Ин-т фармакологии РАМН, 1994.
38. Ostrovskaya R.U., Vakhitova Y.V., Kuzmina U.Sh., Salimgareeva M., Zainullina L.F., Gudasheva T.A., Vakhitov V.A., Seredenin S.B. // *J. Biomed. Sci.* 2014. V. 21. P. 74–82.
39. Jia X., Gharibyan A., Öhman A., Liu Y., Olofsson A., Morozova-Roche L.A. // *J. Mol. Biol.* 2011. V. 414. P. 699–712.
40. Лысенко А.В., Ускова Н.И., Островская Р.У., Гудашева Т.А., Воронина Т.А. // *Эксп. клин. фармакология.* 1997. Т. 60. № 3. С. 15–18.
41. Ostrovskaya R.U., Gruden M.A., Bobkova N.A., Sewell R.D.E., Gudasheva T.A., Samokhin A.N., Seredenin S.B., Noppe W., Sherstnev V.V., Morozova-Roche L.A. // *J. Psychopharmacol.* 2007. V. 21. P. 611–619.
42. Островская Р.У., Цаплина А.П., Вахитова Ю.В., Салимгареева М.Х., Ямиданов Р.С. // *Эксп. клин. фармакология.* 2010. Т. 73. № 1. С. 2–6.
43. Островская Р.У., Озерова И.В., Гудашева Т.А., Капица И.Г., Иванова Е.А., Воронина Т.А., Середенин С.Б. // *Бюл. эксп. биол. и мед.* 2013. Т. 156. № 9. С. 317–321.
44. Островская Р.У., Золотов Н.Н., Озерова И.В., Иванова Е.А., Капица И.Г., Тарабан К.В., Мичунская А.Б., Воронина Т.А., Гудашева Т.А., Середенин С.Б. // *Бюл. эксп. биол. и мед.* 2014. Т. 157. № 3. С. 321–327.
45. Cheng K., Ho K., Stokes R., Scott C., Lau S.M., Hawthorne W.J., O'Connell P.J., Loudovaris T., Kay T.W., Kulkarni R.N., et al. // *J. Clin. Invest.* 2010. V. 120. № 6. P. 2171–2183
46. Liu Y., Liu F., Iqbal K., Grundke-Iqbal I., Gong C.X. // *FEBS Lett.* 2008. V. 582. P. 359–364.
47. van de Velde S., Hogan M.F., Montminy M. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2011. V. 108. № 41. P. 16876–16882.