

©Коллектив авторов

УСТОЙЧИВОСТЬ ПРОЛИНСОДЕРЖАЩИХ ПЕПТИДОВ В БИОЛОГИЧЕСКИХ СРЕДАХ

К.В. Шевченко*, И.Ю. Нагаев, Л.А. Андреева, В.П. Шевченко, Н.Ф. Мясоедов

Институт молекулярной генетики Российской академии наук,
123182, Москва, пл. Курчатова, 2; *эл. почта: ATCarma@mail.ru

Обобщены новые данные о лекарственных препаратах пептидной природы, высокая устойчивость которых обусловлена как за счёт введения Pro-Gly-Pro в различные аминокислотные последовательности, так и за счёт модификации самого глипролинового фрагмента. В качестве пролинсодержащих пептидов использовали Pro-Gly-Pro-Leu, АКГГ(6-9)Pro-Gly-Pro, 5-охо-Pro-Arg-Pro и 5-охо-Pro-His-Pro-NH₂. Получены меченые тритием пептиды: Pro-Gly-Pro-Leu с молярной радиоактивностью – 135 Ки/ммоль, АКГГ(6-9)Pro-Gly-Pro – 26 Ки/ммоль, 5-охо-Pro-Arg-Pro – 60 Ки/ммоль и 5-охо-Pro-His-Pro-NH₂ – 75 Ки/ммоль. При использовании меченых аналогов определено содержание этих пептидов в экспериментах *in vivo*. При интраназальном введении Pro-Gly-Pro-Leu, АКГГ(6-9)Pro-Gly-Pro, 5-охо-Pro-Arg-Pro и 5-охо-Pro-His-Pro-NH₂ в крови обнаружено в среднем в 200 раз больше, чем в мозге. При внутривенном введении в крови в среднем обнаружено в 600 раз больше, чем в мозге. Устойчивость пролинсодержащих пептидов в экспериментах *in vitro* анализировали как при использовании различных коммерчески доступных пептидаз (лейцинаминопептидазы, дипептидазы, карбоксипептидаз В и Y), так и при использовании назальной слизи, микросомальной фракции мозга крыс (МФМК) и плазмы крови крыс. При пептидазном гидролизе Pro-Gly-Pro-Leu основными метаболитами были Gly-Pro-Leu, Pro-Gly-Pro, Gly-Pro и Pro-Gly. При пептидазном гидролизе АКГГ(6-9)Pro-Gly-Pro основными метаболитами были Phe-Arg-Trp-Pro-Gly-Pro, Trp-Pro-Gly-Pro, при пептидазном гидролизе 5-охо-Pro-His-Pro-NH₂ основным метаболитом был 5-охо-Pro-His-Pro. Показано, что при разных способах введения пептидов состав образующихся метаболитов разный. На основании полученных данных оценена устойчивость к ферментативному расщеплению пептидов и пути их метаболизма. Таким образом, эти новые данные показали, что для пролонгации действия глипролинов в живых объектах можно использовать приведенные выше подходы. При этом деградация пролинсодержащих пептидов происходит, главным образом, не за счёт действия пептидаз, а за счёт деградации составляющих пептиды аминокислот. В целом, приведенные в обзоре данные указывают на перспективность использования интраназального способа введения биологически активных пептидов в мозг живых организмов.

Ключевые слова: пептиды; протеолиз; способы введения; тритиймеченные аналоги, распределение в органах

DOI: 10.18097/PBMC20196503180

ВВЕДЕНИЕ

Разработка новых лекарственных препаратов, лишённых побочных эффектов, актуальна для медицины. Пептиды, как класс физиологически активных соединений, являются наиболее подходящими в этом плане соединениями.

Эндогенные пептиды являются природными регуляторами многих физиологических функций в живых организмах. В настоящее время известно уже более 10 миллионов различных пептидов, обладающих физиологическим действием, однако лишь единичные пептиды используются в качестве лекарственных препаратов. Даже в тех случаях, когда модификация исходного эндогенного пептида приводила к созданию соединения с удачным сочетанием различных свойств, оно оказывалось настолько далеким по структуре от исходного регуляторного пептида, что неизбежными становились многолетние трудоёмкие исследования вероятных новых свойств такого соединения, которые либо заканчивались неудачей, либо крайне затягивали его внедрение. Данная проблема связана с тем, что регуляция всех физиологических процессов осуществляется сложными комплексами эндогенных соединений

(синактонами), действующими в определённой последовательности и в определённых сочетаниях [1]. К лучшим и более быстрым результатам приводят синактоны, которые представляют собой модифицированные пептиды, способные и осуществлять функции регуляторных пептидов и быть достаточно устойчивыми в живом организме [2-5].

Перспективной оказалась концепция направленного конструирования пептидов с определёнными физиологическими свойствами, которая основывается на использовании структуры природных пептидов [2]. Согласно этой концепции, сначала определяли минимальную аминокислотную последовательность пептида с определённым физиологическим действием, затем путём присоединения к С- и N-концу такого пептида дополнительных аминокислотных остатков повышали его устойчивость, что делало возможным использовать такие производные на практике. Благодаря данному подходу удалось синтезировать группы пептидов с нейротропной [6], анальгетической [7], нейролептической [8], противовирусной активностью [9]. Таким образом, использование данного пути поиска новых биологически активных пептидов позволило создать ряд лекарственных препаратов [10].

В данной работе предпринята попытка обобщения результатов исследований устойчивости в экспериментах *in vitro* и *in vivo* ряда глипролинов, которые изучались в последние годы [11]. Необходимость данного исследования связана с наличием мощной эндогенной системы деградации пептидов. При каждом акте ферментативного расщепления исходного пептида происходит появление новых пептидов, которые могут отличаться по физиологическому действию от исходного пептида, а более длительное присутствие лекарственного препарата в живом организме, как правило, желательно при лечении различных патологий. Наиболее приемлемым для пролонгации действия фармакофора оказался трипептид Pro-Gly-Pro и глипролины типа X-Pro-X*-Pro-X** (X – природная аминокислота), модифицированные не только X и X**, но и X* [12].

При использовании этого подхода созданы пептиды типа семакс, селанк, которые уже зарекомендовали себя как эффективные лекарственные препараты с направленным физиологическим действием [13-20]. Пептидные препараты этого типа не токсичны [21],

и допустимые дозы при их использовании могут колебаться в широких пределах.

В качестве пептидов, которые по своей ноотропной и нейропротективной активности не уступают семаксу, испытаны различные фрагменты АКТГ (рис. 1) [22].

Наиболее перспективным среди них оказался пептид АКТГ(6-9)PGP. Он уменьшал размер некроза при развитии ишемического инсульта у крыс приблизительно на 50% [22]. Проведённые исследования позволяют выделить АКТГ(6-9)PGP в качестве кандидата пептида с ноотропной и нейропротективной активностью. Показано его положительное биологическое воздействие на жизнеспособность *in vitro* глиальных клеток, полученных из коры больших полушарий мозга крыс, в условиях использования моделей ишемического инсульта [22].

Для исследования эффекта замены отдельных аминокислот в пептиде Pro-Gly-Pro на липидный профиль были синтезированы 5-охо-Pro-Arg-Pro, 5-охо-Pro-Trp-Pro, 5-охо-Pro-His-Pro-NH₂, Pro-Gly-Pro-Leu, Phe-Pro-Leu-Pro-Ala и его метаболиты Pro-Leu-Pro и Pro-Leu-Pro-Ala (рис. 2) [23].

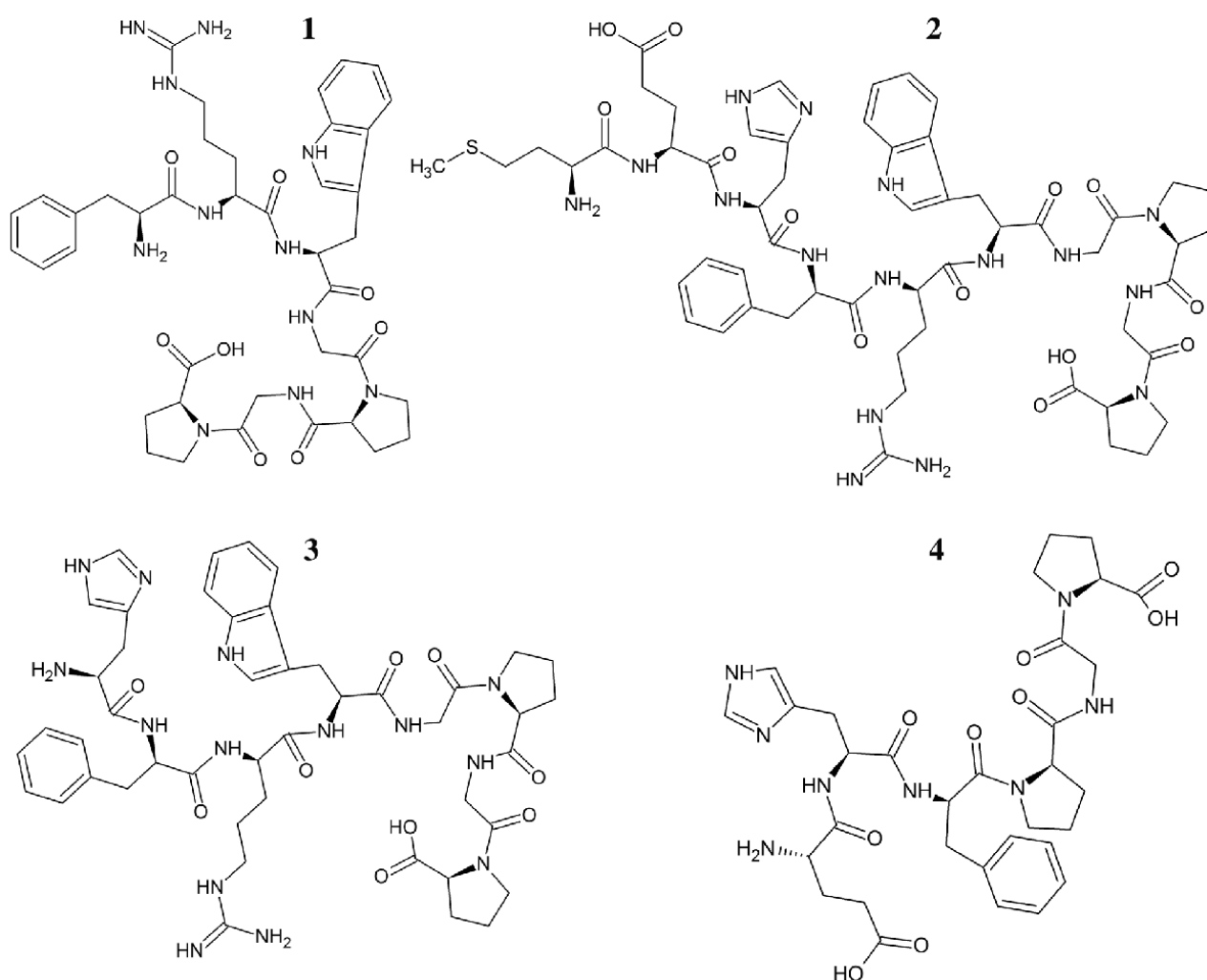


Рисунок 1. Строение пептидов, содержащих фрагменты АКТГ (1 – АКТГ(7-10)PGP [Phe⁷-Arg⁸-Trp⁹-Gly¹⁰-Pro-Gly-Pro], 2 – АКТГ(4-10)PGP [Met⁴-Glu⁵-His⁶-Phe⁷-Arg⁸-Trp⁹-Gly¹⁰-Pro-Gly-Pro], 3 – АКТГ(6-9)PGP [His⁶-Phe⁷-Arg⁸-Trp⁹-Pro-Gly-Pro], 4 – АКТГ(5-7)PGP [Glu⁵-His⁶-Phe⁷-Pro-Gly-Pro]).

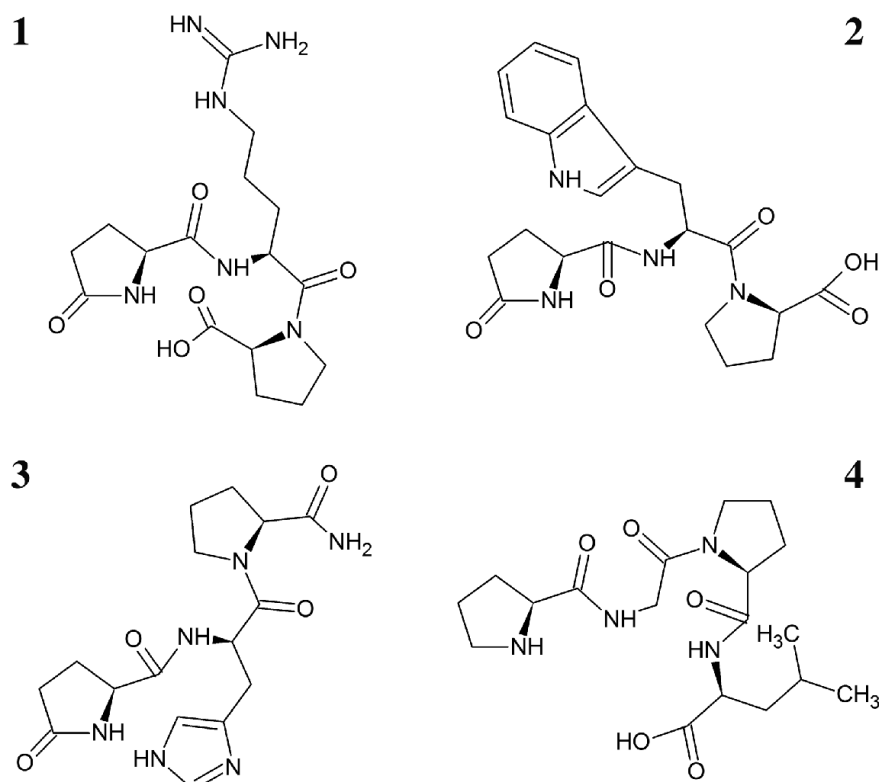


Рисунок 2. Строение пролинсодержащих пептидов (1 – 5-охо-Pro-Arg-Pro, 2 – 5-охо-Pro-Trp-Pro, 3 – 5-охо-Pro-His-Pro-NH₂, 4 – Pro-Gly-Pro-Leu).

Наибольший эффект установлен при действии 5-охо-Pro-Arg-Pro, средний – у 5-охо-Pro-Trp-Pro и практически незначительный – у 5-охо-Pro-His-Pro-NH₂. На крысах с развившимся метаболическим синдромом показано значительное снижение уровня глюкозы в крови при использовании 5-охо-Pro-Arg-Pro [24]. Кроме того, 5-охо-Pro-Arg-Pro снижает агрегацию тромбоцитов, восстанавливает нормальные значения показателей общего холестерина и проявляет антикоагулянтно-фибринолитические и антитромбоцитарные эффекты [24]. Из исследуемых пептидов максимальное гипогликемическое, антитромботическое, гипохолестеринемическое и липидемическое действие оказывал пептид 5-охо-Pro-Arg-Pro при интраназальном пятикратном введении животным с метаболическим синдромом. Аналогичные эффекты обнаружены при использовании метаболитов Phe-Pro-Leu-Pro-Ala (Pro-Leu-Pro и Pro-Leu-Pro-Ala) [25].

Так как в состав Phe-Pro-Leu-Pro-Ala входили такие аминокислоты как лейцин, аланин, которые снижают уровень сахара крови, было изучено влияние Pro-Leu-Pro и Pro-Leu-Pro-Ala на уровень сахара крови на модели метаболического синдрома у крыс. Установлено, что эти пептиды оказывают нормогликемическое действие при повышенном уровне сахара у животных [25]. Кроме этого, Pro-Leu-Pro и Pro-Leu-Pro-Ala исследованы на способность нормализовать жировой обмен в условиях метаболического синдрома [25]. Показано, что эти пептиды могут быть отнесены

к препаратам гиполлипидемического действия, блокирующим накопление новых жировых отложений в организме в условиях развития метаболического синдрома [25]. У крыс, получавших пептиды, параметры жирового обмена приближались или были равнозначны тем же показателям, которые были определены у здоровых крыс (норма) [25].

Ещё одним пептидом, содержащим лейцин, был Pro-Gly-Pro-Leu. Этот пептид использовался как профилактическое, так и лечебное антидиабетогенное средство [26-29]. Показано, что при многократном интраназальном введении Pro-Gly-Pro-Leu не только предупреждал развитие экспериментального аллоксанового диабета, но и оказывал защитное антитромботическое действие, повышая антикоагулянтную и все виды фибринолитической активности. Следовательно, предварительное введение пептида перед поступлением в организм диабетогенного метаболита аллоксана имеет немаловажное значение для проявления его профилактического антидиабетогенного действия. Установлено, что Pro-Gly-Pro-Leu более эффективен при применении его в качестве лечебного препарата. Так, в условиях развития инсулинзависимого сахарного диабета данный пептид обладал гипогликемическим действием, то есть проявлял лечебный антидиабетогенный эффект. Поэтому данный пептид может быть отнесен к перспективным антидиабетическим средствам [26]. Кроме того, Pro-Gly-Pro-Leu может быть использован как нейропротектор [27].

1. УСТОЙЧИВОСТЬ ПЕПТИДОВ *IN VITRO*

Одним из этапов доклинических исследований при создании новых лекарственных препаратов является определение их устойчивости в условиях *in vitro* и *in vivo* [30-32].

С одной стороны, исследования *in vitro*, показывают, для каких протеаз данный пептид является более хорошим субстратом, с другой стороны, используя несколько пептидаз, можно изготовить набор возможных метаболитов, которые затем можно применить для анализа проб, полученных при проведении экспериментов на живых организмах.

Устойчивость пептидов [5-охо-Pro-His-Pro-NH₂, АКТГ(6-9)PGP, Pro-Gly-Pro-Leu и 5-охо-Pro-Arg-Pro] *in vitro* исследована с использованием лейцинаминопептидазы (КФ 3.4.11.2), карбоксипептидазы Y (КФ 3.4.16.1) и В (КФ 3.4.17.2), а также назальной слизи, микросомальной фракции мозга (МФМК) и плазмы крови крыс-самцов Wistar [31, 32].

Пептиды инкубировали в присутствии указанных выше ферментов, и продукты реакции анализировали методом ВЭЖХ и масс-спектрометрии [23, 32-36].

5-охо-Pro-Arg-Pro оказался устойчив в присутствии коммерческих препаратов аминок- и карбоксипептидаз [23]. За 4 ч инкубации при 30°C в присутствии назальной слизи и МФМК ферментативный гидролиз 5-охо-Pro-Arg-Pro проходил лишь на 15-20%. В присутствии плазмы крови – на 25-30%. Поэтому возможные метаболиты, необходимые для исследований *in vivo*, получали химическим синтезом.

Ферментативный гидролиз АКТГ(6-9)PGP под действием коммерческих пептидаз происходил быстрее [35]. Более активной оказалась карбоксипептидаза Y. Ферментные системы МФМК разрушали АКТГ(6-9)PGP за 90 мин полностью. Далее эффективность расщепления этого пептида падала в ряду ферментных систем плазмы крови, крови и назальной слизи (табл. 1).

Полученные данные позволили установить основные пути катаболизма АКТГ(6-9)PGP (рис. 3).

При деградации АКТГ(6-9)PGP в присутствии лейцинаминопептидазы и карбоксипептидазы Y происходило образование Phe-Arg-Trp-Pro-Gly-Pro, Trp-Pro-Gly-Pro, Arg-Trp-Pro-Gly-Pro. Максимум содержания Phe-Arg-Trp-Pro-Gly-Pro наблюдается

Таблица 1. Деградация АКТГ(6-9)PGP в присутствии коммерческих пептидаз, а также назальной слизи, крови, плазмы крови и МФМК

Фермент	Время, мин						
	5	10	30	40	60	90	120
Лейцинаминопептидаза	-	87	67	61	46	31	23
Карбоксипептидаза Y	-	73	30	18	9	0	0
Назальная слизь	81	64	52	45	31	14	0
Кровь	50	47	40	36	12	5	0
Плазма крови	-	-	42	-	16	0,8	0,2
МФМК	85	81	56	49	11	0	0

на 90 мин, а Trp-Pro-Gly-Pro и Arg-Trp-Pro-Gly-Pro – на 180 мин. Последнее обстоятельство указывает на то, что, возможно, и Arg-Trp-Pro-Gly-Pro, и Trp-Pro-Gly-Pro образуются из Phe-Arg-Trp-Pro-Gly-Pro. Установлено, что наиболее устойчивым в присутствии лейцинаминопептидазы оказывается Trp-Pro-Gly-Pro, далее следуют Phe-Arg-Trp-Pro-Gly-Pro и Arg-Trp-Pro-Gly-Pro. Максимальное количество Arg-Trp-Pro-Gly-Pro в инкубационной среде достигает 9%, в то время как для Phe-Arg-Trp-Pro-Gly-Pro и Trp-Pro-Gly-Pro эти значения 30% и 40%, соответственно.

Если расположить АКТГ(6-9)PGP и его метаболиты по устойчивости в присутствии карбоксипептидазы Y, то наиболее устойчивым оказывается His-Phe-Arg-Trp-Pro-Gly. Следовательно, можно ожидать, что в случае ферментативного гидролиза АКТГ(6-9)PGP аминокпептидазами главным метаболитом будет Trp-Pro-Gly-Pro. Аналогично, за ферментативным гидролизом АКТГ(6-9)PGP карбоксипептидазами можно проследить по образованию His-Phe-Arg-Trp-Pro-Gly.

В присутствии ферментов плазмы крови крыс из АКТГ(6-9)PGP образовывались Phe-Arg-Trp-Pro-Gly-Pro и Trp-Pro-Gly-Pro [35]. Это свидетельствует о том, что определяющим фактором ферментативного расщепления АКТГ(6-9)PGP в плазме крови является действие аминокпептидаз.

Pro-Gly-Pro-Leu оказался более устойчивым к действию назальной слизи и плазмы крови. В присутствии МФМК и особенно лейцинаминопептидазы деградация Pro-Gly-Pro-Leu происходила более быстро [32]. Через 30 мин

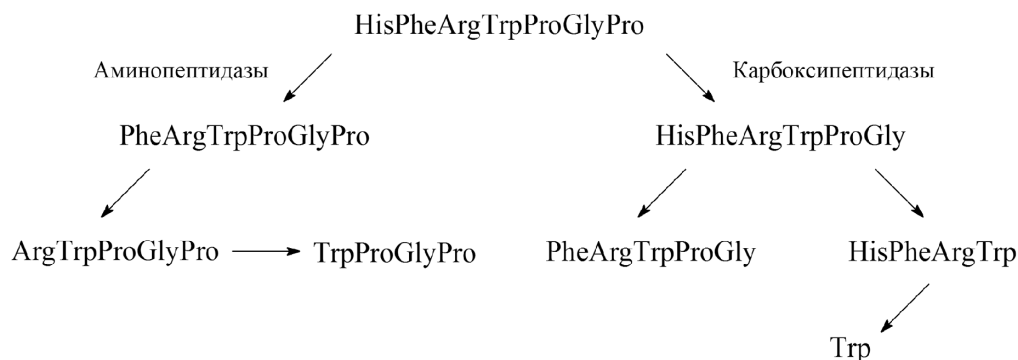


Рисунок 3. Образование метаболитов АКТГ(6-9)PGP под действием протеаз.

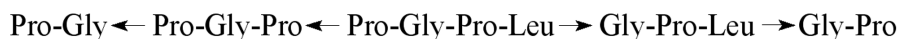


Рисунок 4. Образование метаболитов Pro-Gly-Pro-Leu под действием протеаз.

инкубации в присутствии лейцинаминопептидазы из Pro-Gly-Pro-Leu образовывались Gly-Pro-Leu (57,0%), Pro-Gly-Pro (20,7%) и Gly-Pro (5,4%). Этот фермент катализирует гидролиз Pro-Gly-Pro-Leu и с N-конца, и с C-конца этого пептида. Проведённые эксперименты *in vitro* с перечисленными выше ферментными системами позволили определить и синтезировать, как и в случае АКГГ(6-9)PGP, возможные метаболиты этого пептида, что было необходимо для тестирования проб, полученных в экспериментах *in vivo* (рис. 4) [32].

Очевидно, что Gly-Pro-Leu образуется в результате гидролиза N-концевого пролина, а образование Gly-Pro происходит за счёт синхронного отщепления терминальных аминокислот от Pro-Gly-Pro-Leu. По-видимому, Pro-Gly образуется при расщеплении Pro-Gly-Pro-Leu по связи Gly-Pro.

5-охо-Pro-His-ProNH₂ оказался намного устойчивее, чем семакс к действию лейцинаминопептидазы, в то время как для карбоксипептидазы В эти пептиды в первые часы являются примерно одинаковыми субстратами [36]. Устойчивость 5-охо-Pro-His-ProNH₂ к действию карбоксипептидазы У была намного выше, чем у семакса.

При исследовании устойчивости 5-охо-Pro-His-ProNH₂ в присутствии назальной слизи крыс, МФМК и плазмы крови было обнаружено, что ферментативное расщепление этого пептида происходило наиболее интенсивно в присутствии МФМК, в меньшей степени в плазме крови и назальной слизи. При этом во всех случаях зарегистрировано образование только 5-охо-Pro-His-Pro. Таким образом, устойчивость 5-охо-Pro-His-ProNH₂ к ферментативному расщеплению будет в основном определяться активностью карбоксипептидаз.

2. ПОЛУЧЕНИЕ МЕЧЕНЫХ ПЕПТИДОВ

Для проведения экспериментов *in vivo* были получены меченые тритием аналоги пептидов при помощи хорошо разработанных методов введения тритиевой метки в сложные физиологически активные соединения [37]. В таблице 2 суммированы данные по распределению метки по аминокислотным остаткам исходного пептида и его метаболитов.

Полученные меченые аналоги пептидов имеют молярную радиоактивность (МР), достаточную для проведения экспериментов *in vivo*.

Таблица 2. Включение в пептиды и распределение трития по аминокислотным остаткам

Пептид	МР, Ки/ммоль	Распределение трития, %	Условия реакции	Ссылка
His-Phe-Arg-Trp-Pro-Gly-Pro	26	37:6:20:32:1:1:3	200°C, 15 мин, 5% Pd/Al ₂ O ₃	38
Pro-Gly-Pro-Leu	135	66:17:8:9	185°C, 15 мин, 5% Pd/BaSO ₄	39
5-охо-Pro-Arg-Pro	60	11:58:31	190°C, 10 мин, 5% Pd/BaSO ₄	40
5-охо-Pro-His-Pro-NH ₂	75	18:66:16	200°C, 15 мин, 5% Pd/Al ₂ O ₃	41

3. УСТОЙЧИВОСТЬ ПЕПТИДОВ *IN VIVO*

Устойчивость меченых пептидов оценивали после внутривенного введения в яремную вену или интраназального введения крысам Wistar.

3.1. Исследование устойчивости Pro-Gly-Pro-Leu [23, 42-44]

При интраназальном введении за 1 ч концентрация Pro-Gly-Pro-Leu в крови падала на 98% (с 67,43 до 1,24 пмоль/мл), что заметно больше, чем при использовании ферментных систем, которые испытывались *in vitro*. Содержание Pro-Gly-Pro-Leu в крови при внутривенном введении падала более чем на 90% (с 608,24 до 41,63 пмоль/мл).

При интраназальном введении в течение 1 ч содержание Pro-Gly-Pro-Leu в мозге крыс падало с 1,15 пмоль/г до 0,50 пмоль/г (на 57%). При внутривенном введении за тот же период количество Pro-Gly-Pro-Leu уменьшалось с 4,86 до 1,16 пмоль/г (на 76%). По-видимому, это связано с тем, что после введения Pro-Gly-Pro-Leu в носовую полость происходит постепенная миграция этого пептида из носовой полости в мозг крысы. В результате количество Pro-Gly-Pro-Leu достигает максимума, а затем продолжительное время удерживается на определённом уровне. В случае внутривенного введения этот эффект отсутствует.

Полученные данные свидетельствуют о том, что устойчивость Pro-Gly-Pro-Leu в мозге в экспериментах *in vivo* ниже, чем в экспериментах *in vitro* для МФМК, но выше, чем при использовании лейцинаминопептидазы.

Максимальная концентрация Pro-Gly-Pro-Leu при его интраназальном введении составила в мозжечке 2,37 пмоль/г, в гиппокампе 1,93 пмоль/г, в коре мозга 0,67 пмоль/г. При внутривенном введении максимальная концентрация Pro-Gly-Pro-Leu в отделах мозга крыс была в мозжечке 15,6 пмоль/г, в гиппокампе 18,5 пмоль/г, в коре мозга 3,0 пмоль/г.

Столь значительное расхождение включения Pro-Gly-Pro-Leu в мозг крыс при его интраназальном и внутривенном введении, свидетельствует о том, что при интраназальном введении пептида большая часть Pro-Gly-Pro-Leu из носовой полости или распределялась по другим органам организма крысы, или подвергалась очень быстрой деградации под действием ферментных систем.

Для оценки возможной причины небольшого содержания Pro-Gly-Pro-Leu в мозге крыс при интраназальном введении, определили распределение этого пептида в других органах крыс после данного способа введения.

Содержание Pro-Gly-Pro-Leu достигало в глазах 17,44 пмоль/г, в печени 0,55 пмоль/г, в почках 2,17 пмоль/г, сердце 0,18 пмоль/г, лёгких 7,51 пмоль/г. Таким образом, концентрации пептида на грамм ткани в крови, глазах, лёгких, почках, мозге, печени и сердце крыс соотносятся как 374,4 : 96,9 : 41,7 : 12,1 : 6,4 : 3,1 : 1. Полученные данные показывают, что при интраназальном введении часть пептида при введении в носовую полость попадает не только в мозг и кровь, но и проникает непосредственно в глаза крыс. Если сравнивать соотношение количеств Pro-Gly-Pro-Leu в целых органах, отношение будет выглядеть следующим образом. В крови (13 мл) находится 876,2 пмоль пептида, глазах (0,2 г) – 3,5 пмоль, лёгких (1,8 г) – 13,5 пмоль, почках (4,0 г) – 8,7 пмоль, мозге (2,2 г) – 2,53 пмоль, печени (9,6 г) – 5,3 пмоль и сердце (1,3 г) – 0,2 пмоль, их количества соотносятся как 4381,0 : 17,5 : 67,5 : 43,5 : 12,6 : 26,5 : 1.

При интраназальном введении Pro-Gly-Pro-Leu только 0,56% этого пептида обнаружено в исследованных тканях, то есть основная часть Pro-Gly-Pro-Leu разрушается под действием ферментов носовой полости.

Ферментативные системы в эпителиальных клетках носовой полости катализируют как гидролиз аминокислотной цепочки пептида, так и деградацию составляющих пептиды аминокислот. Условия, при которых аминокислоты могут подвергаться дезаминированию, окислению и т.д., известны [45, 46]. В ферментативном гидролизе пептидов участвуют аминопептидазы, карбоксипептидазы, эндопептидазы. Так, основными метаболитами, образовавшимися из Pro-Gly-Pro-Leu, были Pro-Gly-Pro, Gly-Pro-Leu, Gly-Pro и Pro-Gly. В мозге крыс на долю Gly-Pro в общем количестве обнаруженных меченых пептидов приходилось 69%, на Pro-Gly – 13%, на Gly-Pro-Leu – 10%, на Pro-Gly-Pro-Leu и Pro-Gly-Pro – 4% [33].

Как уже отмечалось, деградация пептидов происходит не только за счёт ферментативного гидролиза, но и деградации составляющих пептиды аминокислот [45-47]. Поэтому в биологических пробах после введения в живые организмы пептидов образуется большое количество легколетучей фракции (ЛФ), например, тритиевой воды. Это объясняет большую потерю радиоактивности при упаривании проб, полученных из мозга крыс при интраназальном введении Pro-Gly-Pro-Leu.

Из данных, полученных при оценке устойчивости Pro-Gly-Pro-Leu, следует, что при внутривенном введении Pro-Gly-Pro-Leu кинетика изменения концентрации этого пептида в крови крыс имеет типичный для данного способа введения экспоненциальный характер. Установлено, что через 3 ч после введения пептид практически не обнаруживается в крови [43]. Анализ полученных

данных указывает на плохое удерживание пептида Pro-Gly-Pro-Leu в крови и быстрое распределение в организме. Уже через 5 мин после введения пептида устанавливается полное равновесие в его распределении между кровью и внесосудистой средой (тканями), которое впоследствии поддерживается в течение всего последующего времени, вплоть до его полного исчезновения в крови.

При интраназальном способе введения пептида Pro-Gly-Pro-Leu все кривые зависимости концентрации пептида в крови от времени имели колоколообразный вид с максимумом от 5 до 20 мин. Практически полное исчезновение пептида в крови наблюдается также через 3 ч после введения.

Рассчитанные значения фармакокинетических параметров для внутривенного и интраназального введения приведены в таблице 21 (см. раздел “Заключение”) [48].

3.2. Исследование устойчивости АКТГ(6-9)PGP [49, 50]

При определении концентрации АКТГ(6-9)PGP в крови после интраназального введения наблюдали максимум общей радиоактивности и меченого АКТГ(6-9)PGP через 120 мин после введения пептида (1,12 пмоль/мл). При этом, исходя из проведённых расчётов, общее содержание АКТГ(6-9)PGP в крови через 120 мин составляло около 0,08% от введенной дозы. Через 5 ч после интраназального введения пептида содержание АКТГ(6-9)PGP снижалось до 0,13 пмоль/мл.

При внутривенном введении радиоактивность проб крови крыс со временем неуклонно снижалась от 2,12 пмоль/мл до 0,11 пмоль/мл.

Содержание АКТГ(6-9)PGP в печени, почках, сердце, лёгких и мозге при разных способах его введения приведено на рисунке 5. Видно, что содержание АКТГ(6-9)PGP в разных органах сильно различалось. Наибольшее содержание было выявлено в почках и печени, а наименьшее – в мозге. Как следует из полученных данных, основную роль в экскреции АКТГ(6-9)PGP из организма играют почки.

Максимальное содержание АКТГ(6-9)PGP во всех органах обнаруживалось в первой временной точке (10 мин), а далее наблюдается постепенное снижение концентрации АКТГ(6-9)PGP.

В отличие от внутривенного введения АКТГ(6-9)PGP, при интраназальном способе введения исходный пептид и продукты его деградации попадают в ткани крыс более сложным путём. Сначала из носовой полости пептиды абсорбируются в капиллярной сети кровеносных сосудов носовой полости, затем через кровоток поступают в различные ткани и органы. Наибольшая концентрация пептида выявлена в почках, печени и лёгких (0,5–1,0 пмоль/г, во временном интервале после введения 30–120 мин), а наименьшая – в мозге (0,05–0,1 пмоль/г, в интервале 30–120 мин). Абсолютные значения концентраций пептида на исследуемых временных отрезках были значительно ниже, чем при внутривенном введении. В мозге уровень АКТГ(6-9)PGP при обоих способах введения мало отличался.

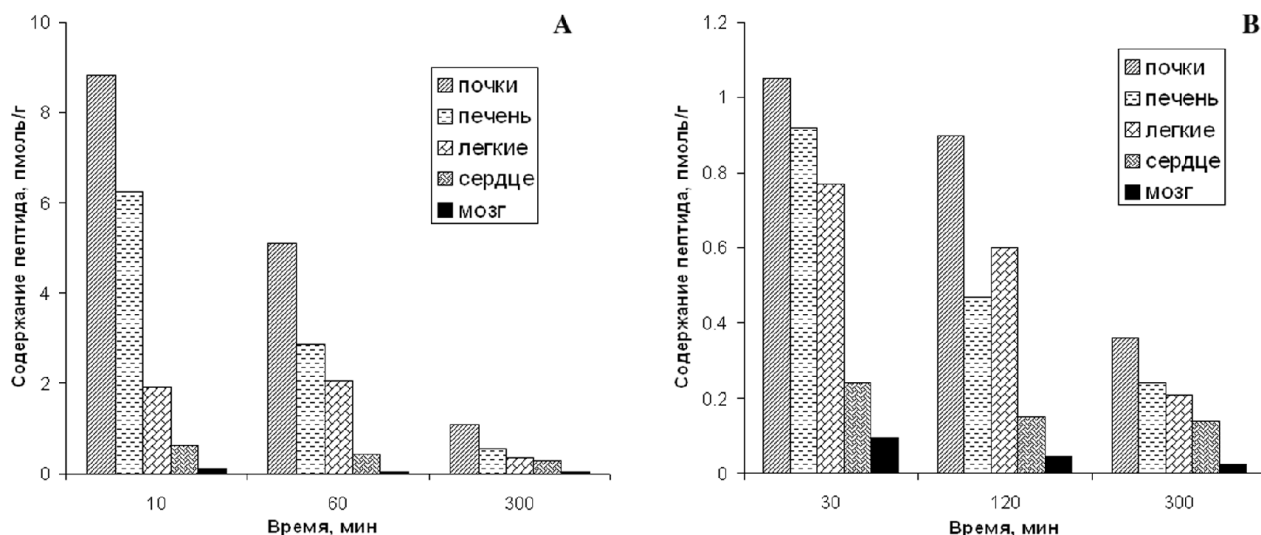


Рисунок 5. Динамика изменения содержания АКТГ(6-9)PGP в тканях и органах (А – при внутривенном введении; В – при интраназальном введении).

Используя приведённые выше экспериментальные данные, был рассчитан кажущийся коэффициент распределения лекарственного вещества (K_d ; показатель тропности ткани/органа относительно крови). Исходя из полученных расчётов, тропность АКТГ(6-9)PGP к тканям возрастала в ряду: мозг < сердце < лёгкие < печень < почки. При этом в почках, печени и лёгких содержание АКТГ(6-9)PGP в условиях равновесия многократно выше, а в мозге – многократно ниже уровня в крови. Также следует отметить, что способность накапливаться в органах (тропность) Pro-Gly-Pro-Leu была существенно меньшей по сравнению с АКТГ(6-9)PGP (табл. 3).

Как и в случае работы с Pro-Gly-Pro-Leu, деградация АКТГ(6-9)PGP происходила как за счёт ферментативного расщепления, так и за счёт деградации составляющих пептиды аминокислот. И в этом случае основные потери наблюдались из-за образования ЛФ. Установлено, что со временем доля, приходящаяся на продукты окисления, возрастает при внутривенном введении – с 43% до 81%, а при интраназальном введении – от 32% до 61%.

Методом ВЭЖХ определяли содержание метаболитов АКТГ(6-9)PGP в полученных пробах крови как при внутривенном введении, так и при интраназальном введении (табл. 4).

Таблица 3. Сравнение значений кажущегося коэффициента распределения АКТГ(6-9)PGP и Pro-Gly-Pro-Leu для разных органов [24]

Орган	$K_d = C(t)_{\text{орган}}/C(t)_{\text{кровь}}$	
	АКТГ(6-9)PGP	Pro-Gly-Pro-Leu
почки	11,1	3,4
печень	6,2	0,86
лёгкие	4,5	-
сердце	1,0	0,28
мозг	0,12	0,11

Это позволило выяснить, как изменяется содержание этих метаболитов во времени и определить основные пути деградации АКТГ(6-9)PGP в зависимости от способа введения.

Установлено, что при внутривенном введении все максимальные значения содержания метаболитов приходятся на первые минуты после введения исходного пептида. А при интраназальном введении наблюдаются максимумы содержания метаболитов, причины появления которых сходны с появлением максимумов, обнаруженных при работе с Pro-Gly-Pro-Leu (см. раздел 3.1). Полученные данные показали, что в крови происходит быстрая деградация АКТГ(6-9)PGP и его метаболитов.

На рисунке 6 показано процентное соотношение между АКТГ(6-9)PGP, Phe-Arg-Trp-Pro-Gly-Pro, Trp-Pro-Gly-Pro и His-Phe-Arg-Trp-Pro-Gly в крови крыс в зависимости от времени после введения исходного пептида.

В таблицах 5 и 6 приведено процентное содержание аминокислот, триптофана, Pro-Gly-Pro, а также Gly-Pro вместе с Pro-Gly, и суммарного количества АКТГ(6-9)PGP, Phe-Arg-Trp-Pro-Gly-Pro, Trp-Pro-Gly-Pro и His-Phe-Arg-Trp-Pro-Gly в крови крыс в зависимости от времени отбора пробы (за 100% принята сумма всех этих соединений в пробах).

Как видно из приведённых данных, со временем наблюдается небольшое увеличение вклада Trp-Pro-Gly-Pro и His-Phe-Arg-Trp-Pro-Gly в общем содержании АКТГ(6-9)PGP, Phe-Arg-Trp-Pro-Gly-Pro, Trp-Pro-Gly-Pro и His-Phe-Arg-Trp-Pro-Gly. Относительное количество Phe-Arg-Trp-Pro-Gly-Pro в крови сначала стабильно, но через два часа начинает падать. Относительное содержание АКТГ(6-9)PGP падает практически в два раза. Основным метаболитом при внутривенном и интраназальном введении является Trp-Pro-Gly-Pro.

Таблица 4. Зависимость содержания в крови крыс Phe-Arg-Trp-Pro-Gly-Pro, Trp-Pro-Gly-Pro и Pro-Gly-Pro от времени после введения АКТИ(6-9)PGP [49]

Время, мин	Концентрация в крови, пмоль/мл					
	Phe-Arg-Trp-Pro-Gly-Pro		Trp-Pro-Gly-Pro		Pro-Gly-Pro	
5	2,62*	0,22**	10,14*	0,78**	99,42*	4,97**
10	1,97	0,47	8,34	0,84	69,85	5,33
30	1,35	0,52	4,57	0,86	36,37	5,44
60	0,83	0,52	3,21	0,93	16,96	7,57
120	0,72	0,58	1,69	1,02	14,83	13,05
180	0,20	0,38	0,80	1,26	7,22	19,45
300	0,15	0,11	0,20	0,25	5,24	4,16

Примечание: * – при внутривенном введении; ** – при интраназальном введении.

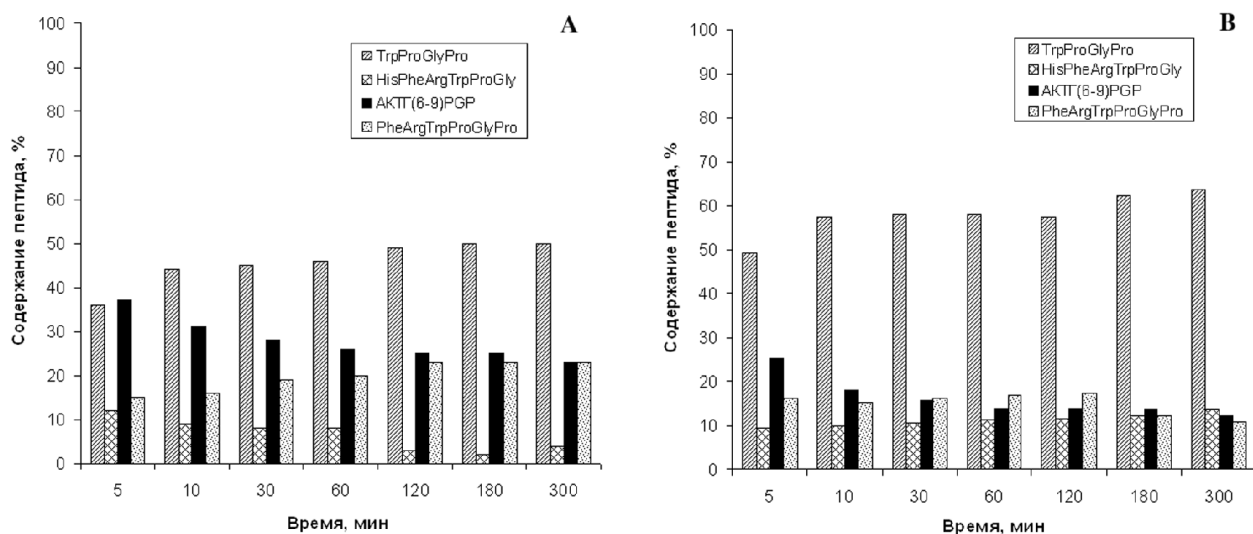


Рисунок 6. Зависимость от времени соотношения АКТИ(6-9)PGP, Phe-Arg-Trp-Pro-Gly-Pro, Trp-Pro-Gly-Pro и His-Phe-Arg-Trp-Pro-Gly в крови крыс (А – при внутривенном введении; В – при интраназальном введении) (за 100% принято общее содержание этих соединений в пробах) [50].

Таблица 5. Содержание АКТИ(6-9)PGP и его метаболитов в пробах крови при интраназальном введении [50]

Пептиды и аминокислоты	Время, мин						
	5	10	30	60	120	180	300
Аминокислоты	3,1	12,0	17,6	18,5	27,6	39,7	52,1
Pro-Gly + Gly-Pro	14,3	15,9	25,5	25,9	24,0	22,9	18,8
Pro-Gly-Pro	65,9	53,1	39,1	32,3	30,6	27,1	23,3
Trp	2,7	5,3	6,0	12,7	8,6	3,3	1,9
Trp-Pro-Gly-Pro + His-Phe-Arg-Trp-Pro-Gly + АКТИ(6-9)PGP + Phe-Arg-Trp-Pro-Gly-Pro	14,0	13,7	11,4	11,0	9,2	7,0	3,9

Примечание: за 100% принято общее содержание суммы этих соединений в пробах.

Таблица 6. Относительное содержание АКТИ(6-9)PGP и его метаболитов в крови при внутривенном введении [50]

Пептиды и аминокислоты	Время, мин						
	5	10	30	60	120	180	300
Аминокислоты	18,1	18,9	28,1	29,9	32,2	34,0	40,6
Pro-Gly + Gly-Pro	13,9	19,8	21,4	23,2	27,4	29,0	45,3
Pro-Gly-Pro	54,9	25,2	33,4	30,3	29,4	27,9	11,7
Trp	7,1	29,4	9,9	8,2	3,9	3,5	1,3
Trp-Pro-Gly-Pro + His-Phe-Arg-Trp-Pro-Gly + АКТИ(6-9)PGP + Phe-Arg-Trp-Pro-Gly-Pro	6,0	6,7	7,2	8,4	7,1	5,6	1,1

Примечание: за 100% принято общее содержание этих соединений в крови.

УСТОЙЧИВОСТЬ ПРОЛИНСОДЕРЖАЩИХ ПЕПТИДОВ В БИОЛОГИЧЕСКИХ СРЕДАХ

В первые минуты после интраназального введения АКТГ(6-9)PGP (табл. 5) основным продуктом является Pro-Gly-Pro, затем его количество постепенно падает, также падает вклад суммарного количества АКТГ(6-9)PGP, Phe-Arg-Trp-Pro-Gly-Pro, Trp-Pro-Gly-Pro и His-Phe-Arg-Trp-Pro-Gly, а относительное количество аминокислот неуклонно растёт. Вклад триптофана и суммы Gly-Pro и Pro-Gly в крови крыс, в зависимости от времени получения пробы, имеет максимум на 60 мин.

Как видно из данных таблицы 6, при внутривенном введении в крови общее количество

АКТГ(6-9)PGP и его метаболитов, которые состоят из не менее, чем четырёх аминокислотных остатков, составляло от 1,1% до 8,4%. Как и в случае интраназального введения, при внутривенном введении вначале преобладает Pro-Gly-Pro, затем его количество постепенно падает, а относительное количество аминокислот и суммарное количество Gly-Pro и Pro-Gly постоянно растёт.

Состав метаболитов АКТГ(6-9)PGP в почках, печени, лёгких, мозге и сердце при интраназальном и внутривенном введении пептида приведён в таблицах 7-11.

Таблица 7. Состав метаболитов АКТГ(6-9)PGP в почках.

Пептиды и Трп	Время, мин					
	10	60	300	30	120	300
Трп	22,36*	19,21*	2,71*	2,46**	1,52**	0,64**
Arg-Trp-Pro-Gly-Pro	6,55	7,00	1,36	0,91	0,71	0,28
Trp-Pro-Gly-Pro	18,68	12,88	2,56	2,47	1,67	0,54
АКТГ(6-9)PGP	8,82	5,09	1,08	1,05	0,90	0,36
Phe-Arg-Trp-Pro-Gly-Pro	2,64	5,03	1,28	0,49	0,87	0,64

Примечание. Здесь и в таблицах 8-11: * – при внутривенном введении; ** – при интраназальном введении (пмоль/г ткани).

Таблица 8. Состав метаболитов АКТГ(6-9)PGP в печени

Пептиды и Трп	Время, мин					
	10	60	300	30	120	300
Трп	8,05*	4,69*	1,67*	0,95**	0,86**	0,69**
Arg-Trp-Pro-Gly-Pro	2,98	2,52	0,63	0,52	0,38	0,25
Trp-Pro-Gly-Pro	18,29	8,40	0,95	2,72	1,14	1,06
АКТГ(6-9)PGP	6,24	2,87	0,56	0,92	0,47	0,24
Phe-Arg-Trp-Pro-Gly-Pro	1,34	1,71	0,63	0,68	0,46	0,42

Таблица 9. Состав метаболитов АКТГ(6-9)PGP в сердце

Пептиды и Трп	Время, мин					
	10	60	300	30	120	300
Трп	5,41*	2,21*	0,54*	1,44**	0,40**	0,30**
Arg-Trp-Pro-Gly-Pro	1,62	0,43	0,29	0,25	0,20	0,17
Trp-Pro-Gly-Pro	3,30	1,57	0,44	0,59	0,42	0,24
АКТГ(6-9)PGP	0,62	0,44	0,27	0,24	0,15	0,14
Phe-Arg-Trp-Pro-Gly-Pro	0,16	0,40	0,32	0,23	0,21	0,16

Таблица 10. Состав метаболитов АКТГ(6-9)PGP в лёгких

Пептиды и Трп	Время, мин					
	10	60	300	30	120	300
Трп	5,95*	2,85*	0,50*	1,10**	1,10**	0,28**
Arg-Trp-Pro-Gly-Pro	0,76	0,74	0,26	0,16	0,54	0,16
Trp-Pro-Gly-Pro	4,38	3,60	0,54	0,93	2,14	0,43
АКТГ(6-9)PGP	2,07	1,91	0,37	0,77	0,60	0,21
Phe-Arg-Trp-Pro-Gly-Pro	0,39	0,61	0,45	0,22	0,52	0,16

Таблица 11. Состав метаболитов АКТГ(6-9)PGP в мозге

Пептиды и Трп	Время, мин					
	10	60	300	30	120	300
Трп	2,01*	0,97*	0,05*	0,60**	0,12**	0,09**
His-Phe-Arg-Trp-Pro-Gly	0,07	0,07	0,01	0,04	0,02	0,02
Trp-Pro-Gly-Pro	0,27	0,25	0,04	0,15	0,06	0,03
АКТГ(6-9)PGP	0,12	0,05	0,03	0,10	0,05	0,02
Phe-Arg-Trp-Pro-Gly-Pro	0,10	0,02	0,01	0,04	0,02	0,01

При интраназальном введении АКТГ(6-9)PGP в почках содержание пептидов за исключением Phe-Arg-Trp-Pro-Gly-Pro со временем падает. Максимальное содержание Phe-Arg-Trp-Pro-Gly-Pro наблюдается через 1 ч после введения АКТГ(6-9)PGP. При внутривенном введении АКТГ(6-9)PGP в том же органе максимальное содержание Phe-Arg-Trp-Pro-Gly-Pro и Arg-Trp-Pro-Gly-Pro наблюдается через 1 ч после введения исходного пептида; концентрация остальных пептидов со временем падает.

При интраназальном введении АКТГ(6-9)PGP содержание всех пептидов в печени со временем падает. При внутривенном введении АКТГ(6-9)PGP в печени содержание пептидов, за исключением Phe-Arg-Trp-Pro-Gly-Pro, со временем падает. Максимальное содержание Phe-Arg-Trp-Pro-Gly-Pro наблюдается через 2 ч после введения АКТГ(6-9)PGP.

При интраназальном введении АКТГ(6-9)PGP содержание всех пептидов в сердце со временем падает. При внутривенном введении АКТГ(6-9)PGP в сердце содержание пептидов, за исключением Phe-Arg-Trp-Pro-Gly-Pro, со временем падает. Максимальное содержание Phe-Arg-Trp-Pro-Gly-Pro наблюдается через 1 ч после введения АКТГ(6-9)PGP.

При интраназальном введении АКТГ(6-9)PGP в лёгких (в отличие от других органов) содержание большинства пептидов имело максимальные значения через 2 ч после введения исходного пептида, и только содержание АКТГ(6-9)PGP со временем неизменно падало. При внутривенном введении АКТГ(6-9)PGP в лёгких максимальное значение содержания наблюдается только у Phe-Arg-Trp-Pro-Gly-Pro через 1 ч после введения исходного пептида, содержание остальных пептидов со временем только падало.

Данные о содержании пептидов при интраназальном и внутривенном введении АКТГ(6-9)PGP в мозге крыс представлены в таблице 11. Эти данные свидетельствуют о том, что содержание всех метаболитов со временем падает. При этом необходимо отметить, что наличие His-Phe-Arg-Trp-Pro-Gly, свидетельствует о том, что в мозге крысы на гидролиз АКТГ(6-9)PGP заметное влияние оказывали карбоксипептидазы. Также обращает на себя внимание то, что содержание АКТГ(6-9)PGP в мозге крыс при внутривенном и интраназальном введении по сравнению с другими органами отличаются меньше.

Таким образом, исследование распределения АКТГ(6-9)PGP в организме после интраназального и внутривенного введения, выявило большие различия между содержанием пептида в разных органах, что указывает на наличие у него избирательной тропности в отношении отдельных тканей, прежде всего крови и почек. Основные потери радиоактивности происходят из-за образования ЛФ (см. раздел 3.1). Основными нелетучими метаболитами АКТГ(6-9)PGP в крови и мозге являются Phe-Arg-Trp-Pro-Gly-Pro, Arg-Trp-Pro-Gly-Pro, Trp-Pro-Gly-Pro, His-Phe-Arg-Trp-Pro-Gly и аминокислоты.

Анализ рассчитанных фармакокинетических параметров позволяет сделать ряд важных выводов относительно поведения АКТГ(6-9)PGP при разных способах введения. При внутривенном введении характер изменения содержания пептида в крови указывает на быстрое распределение его в организме и уже через 5 мин после введения пептида, в основном, завершается фаза активного перераспределения его между кровью и внесосудистой средой (тканями). Одновременно происходит интенсивный метаболизм АКТГ(6-9)PGP, о чём свидетельствуют данные по содержанию АКТГ(6-9)PGP в тканях. Содержание АКТГ(6-9)PGP в крови после установившегося равновесия (30 мин) определяется, главным образом, его выведением из организма и деградацией как непосредственно в самой крови, так и в тканях. Процесс элиминации АКТГ(6-9)PGP из крови и организма в целом происходит относительно медленно в сравнении с Pro-Gly-Pro-Leu. Процессы элиминации АКТГ(6-9)PGP характеризуются относительно невысоким значением константы скорости элиминации, и высоким значением общего клиренса. Время полувыведения АКТГ(6-9)PGP составило около 85 мин, а среднее время пребывания АКТГ(6-9)PGP в организме – 108 мин. Полученные данные позволяют предположить, что в крови и других тканях крыс имеются системы, которые относительно долго могут удерживать пептид, предохраняя его от быстрой деградации пептидазами.

При сравнении фармакокинетических показателей, полученных для АКТГ(6-9)PGP и Pro-Gly-Pro-Leu, оказалось, что как процесс распределения Pro-Gly-Pro-Leu, так и его элиминации из крови происходит намного быстрее, чем АКТГ(6-9)PGP. Среднее время пребывания Pro-Gly-Pro-Leu в организме также оказалось ниже, чем у АКТГ(6-9)PGP, несмотря на то, что АКТГ(6-9)PGP удерживается в крови гораздо хуже, чем Pro-Gly-Pro-Leu. В целом, при внутривенном введении АКТГ(6-9)PGP демонстрирует более длительное пребывание в кровотоке, но в гораздо меньших концентрациях, чем Pro-Gly-Pro-Leu.

Анализ полученной зависимости концентрации АКТГ(6-9)PGP от времени при интраназальном введении позволил рассчитать основные фармакокинетические параметры. Приведенные параметры характеризуют процессы абсорбции вещества с места его введения в кровь, его элиминации и т.д. Максимальная концентрация вещества в ткани наблюдалась через 120 мин, а значение максимальной концентрации вещества в ткани около 1,0 нг/мл. Показатели, характеризующие скорости абсорбции и элиминации, оказались весьма близкими. Расчётное время полной абсорбции АКТГ(6-9)PGP из слизистой составило 161 мин. Значения константы скорости элиминации вещества и времени нахождения пептида в организме оказались несколько большими, чем соответствующие показатели, полученные для внутривенного введения. При этом значение общего клиренса несколько уменьшилось.

УСТОЙЧИВОСТЬ ПРОЛИНСОДЕРЖАЩИХ ПЕПТИДОВ В БИОЛОГИЧЕСКИХ СРЕДАХ

Расчёт абсолютной биодоступности АКТИГ(6-9)PGP указывает на то, что при интраназальном введении величина всасывания пептида в кровь хорошая.

Рассчитанные значения фармакокинетических параметров для внутривенного и интраназального введения приведены в таблице 21 (см. раздел “Заключение”) [24].

3.3. Исследование устойчивости 5-охо-Pro-Arg-Pro [12, 51]

Деградация данного пролинсодержащего пептида, как и других рассмотренных в данном обзоре пептидов, происходила не только за счёт ферментативного гидролиза, но и за счёт дегградации аминокислотных остатков, составляющих пептид. При работе с этим пептидом наблюдались те же закономерности. При внутривенном и интраназальном введении пептида в пробах крови крыс после удаления ЛФ происходило снижение радиоактивности проб. При внутривенном введении пептида и до удаления, и после удаления ЛФ радиоактивной метки в пробах значительно больше, чем при интраназальном введении пептида. Как и в крови, в мозге крыс при внутривенном

введении, по сравнению с интраназальным введением пептида, содержание 5-охо-Pro-Arg-Pro оказалось заметно выше. И в крови, и в мозге доля аминокислот со временем росла (при интраназальном введении пептида от 63% до 85%, при внутривенном введении от 64% до 96%).

Исходя из радиоактивности проб, при интраназальном и внутривенном введении 5-охо-Pro-Arg-Pro, с учётом потерь, рассчитано содержание этого пептида в крови и мозге крыс в пмолях (табл. 12).

Из приведенных данных видно, что при внутривенном введении пептида содержание 5-охо-Pro-Arg-Pro и в мозге, и в крови крыс со временем падает. При интраназальном введении содержание 5-охо-Pro-Arg-Pro в мозге крыс имеет максимум через 10 мин после начала эксперимента, а в крови крыс через 30 мин.

Для выяснения характера распределения 5-охо-Pro-Arg-Pro в организме и установления путей его выведения исследовали содержание меченого трипептида в разных органах крысы после внутривенного или интраназального введения (табл. 13).

Таблица 12. Содержание 5-охо-Pro-Arg-Pro в крови и мозге крыс [51]

Время, мин	Интраназальный способ введения		Внутривенный способ введения	
	Мозг	Кровь	Мозг	Кровь
5	1,70	15,46	13,24	667,54
10	3,15	29,92	9,48	539,23
30	1,02	43,08	2,82	207,08
60	0,44	30,46	0,76	41,31
90	0,32	16,31	0,46	36,85
120	0,27	15,23	0,36	12,85
180	0,14	4,92	0,20	5,31

Примечание: данные представлены в пмоль/г (мозг) или пмоль/мл (кровь), время – количество минут после введения 5-охо-Pro-Arg-Pro.

Таблица 13. Содержание 5-охо-Pro-Arg-Pro в тканях при внутривенном или интраназальном введении пептида крысам [24]

Время, мин	Концентрация 5-охо-Pro-Arg-Pro ^a				
	кровь	печень	почки	сердце	лёгкие
Внутривенное введение					
5	255,3 (6)	13,7 (21)	4417,9 (30)	76,2 (40)	88,5 (13)
10	186,3 (8)	10,2 (24)	1791,0 (45)	49,9 (3)	34,0 (13)
30	70,0 (7)	4,8 (44)	1046,5 (50)	24,5 (38)	23,8 (35)
60	14,5 (10)	3,9 (29)	346,8 (26)	4,5 (39)	9,9 (37)
120	5,2 (16)	3,0 (31)	28,4 (38)	3,5 (25)	3,5 (27)
Интраназальное введение					
5	5,91 (32)	0,22 (26)	8,54 (38)	0,79 (30)	1,01 (30)
10	11,44 (12)	0,31 (10)	32,07 (11)	1,58 (13)	2,17 (7)
30	16,47 (10)	0,41 (30)	14,46 (29)	1,91 (54)	3,78 (35)
60	11,63 (24)	1,01 (20)	23,55 (35)	2,22 (44)	4,38 (21)
120	5,83 (11)	0,47 (20)	6,37 (43)	0,77 (16)	4,21 (20)

Примечание. ^a – приведены концентрации 5-охо-Pro-Arg-Pro в экстрактах тканей (нг/г). В скобках приведены значения в процентах. В крови рассчитывали на мл, в органах на грамм сырой ткани.

Видно, что наибольшее содержание трипептида при обоих способах введения обнаруживается в почках, причём содержание его в почках было значительно выше, чем в крови. Эти данные указывают на ключевую роль почек в выведении 5-охо-Pro-Arg-Pro из организма. В других исследуемых органах концентрация пептида была ниже или соизмерима с концентрацией в крови, но при этом значительно выше, чем в мозге. Следует также обратить внимание на то, что при интраназальном введении уровень концентрации пептида в почках был многократно ниже, чем при внутривенном введении на всем исследуемом временном интервале, что может быть важным аргументом при выборе оптимального способа введения этого пептида при возможном его фармакологическом применении в медицине.

Сначала, при интраназальном введении пептида, из-за диффузии 5-охо-Pro-Arg-Pro и продуктов его деградации из носовой полости крыс в кровотока радиоактивность проб в крови крыс растёт. Содержание аминокислот и содержание 5-охо-Pro-Arg-Pro после интраназального введения пептида максимально в районе 30 мин. Дальнейшее уменьшение количества пептида в пробах связано с тем, что диффузия пептида в кровь животного из носовой полости прекращается. После внутривенного введения пептида содержание 5-охо-Pro-Arg-Pro за 3 ч падает более, чем в 100 раз. Через несколько часов количества радиоактивных продуктов при внутривенном и интраназальном введении пептида в крови крыс выравниваются.

Даже в первые минуты после внутривенного введения меченого пептида его максимальное количество оказалось не более 9% от заведённого количества, что указывает на то, что происходит быстрая диффузия пептида и продуктов его деградации из кровотока.

Как и в случае с содержанием метки в пробах крови, количество трития в пробах мозга крыс при внутривенном введении выше, чем при интраназальном введении пептида, как до удаления ЛФ, так и после. Но, необходимо отметить, что до удаления ЛФ при интраназальном и внутривенном введении 5-охо-Pro-Arg-Pro радиоактивности проб мозга крыс (через 30 и более мин после введения пептида) близки. В то же время, после удаления ЛФ радиоактивность проб при интраназальном введении пептида в 3-4 раза меньше, чем радиоактивность проб при внутривенном введении. В первые 5 мин содержание 5-охо-Pro-Arg-Pro и продуктов его деградации в мозге крыс при интраназальном введении примерно в 8 раз меньше, чем при внутривенном введении пептида.

Анализ полученных результатов указывает на то, что значения параметров типичны для коротких пептидов, в частности это относительно короткое время полувыведения – десятки минут. При этом следует отметить некоторые важные результаты, полученные для интраназального способа введения. Это, прежде всего, относительно

высокая скорость всасывания (время полувсасывания в кровь – около 10 мин), более медленная, чем при внутривенном введении элиминация пептида из крови и высокая для пептидов абсолютная биодоступность – около 27%.

Рассчитанные значения фармакокинетических параметров для внутривенного и интраназального введения приведены в таблице 21 (см. раздел “Заключение”) [24].

3.4. Исследование устойчивости 5-охо-Pro-His-ProNH₂ [52, 53]

Перед определением включения 5-охо-Pro-His-ProNH₂ в различные органы и ткани организма, как и в предыдущих случаях, оценивали деградацию 5-охо-Pro-His-ProNH₂ за счёт гидролиза и за счёт разрушения аминокислотных остатков в пептиде и его метаболитах. Определяли радиоактивность проб из крови и мозга крыс до и после упаривания экстрактов, полученных при интраназальном и внутривенном введении 5-охо-Pro-His-ProNH₂. Радиоактивность в пробах крови была примерно в 30 раз ниже по сравнению с максимальными значениями и при интраназальном, и при внутривенном введении. При этом необходимо отметить, что во всех случаях со временем, доля ЛФ растёт, то есть растёт количество меченых продуктов непротеазной деградации 5-охо-Pro-His-ProNH₂. Потери метки при упаривании экстрактов из крови меньше, чем при упаривании экстрактов из мозга крыс. А при интраназальном введении потери метки выше, чем при внутривенном введении метки. Подобный результат свидетельствует о том, что в носовой полости происходит более интенсивное окисление исходного пептида, чем в крови крыс, поэтому относительно больше количество ЛФ попадает в мозг животного при интраназальном введении меченого 5-охо-Pro-His-ProNH₂.

При удалении ЛФ из проб мозга после интраназального введения 5-охо-Pro-His-ProNH₂ метки остаётся около 2%, а при внутривенном введении около 8%. Подвижной метки в крови крыс значительно меньше. Поэтому, после удаления ЛФ при интраназальном введении пептида, в пробах крови метки остаётся около 32%, а при внутривенном введении около 27%.

Таким образом, содержание 5-охо-Pro-His-ProNH₂ и его метаболитов, которое обнаруживается в мозге крыс при интраназальном введении меченого 5-охо-Pro-His-ProNH₂, в два раза меньше, чем у Pro-Gly-Pro-Leu [42]. По-видимому, это связано с тем, что абсорбция биологически активных соединений в носовой полости происходит главным образом за счёт пассивной диффузии. Поскольку слизистая оболочка носа преимущественно липофильна, степень абсорбции пептидов будет зависеть от их липофильности [54, 55]. Отсюда следует, что транспорт более полярных соединений будет затруднён в большей степени. Меньшая скорость диффузии будет способствовать более эффективному механизму деградации этих соединений под действием различных ферментных систем.

УСТОЙЧИВОСТЬ ПРОЛИНСОДЕРЖАЩИХ ПЕПТИДОВ В БИОЛОГИЧЕСКИХ СРЕДАХ

Кинетика изменения радиоактивности проб из крови крыс в зависимости от времени после внутривенного и интраназального введения меченого 5-охо-Pro-His-ProNH₂ приведена в таблицах 14 и 15.

Таким образом, после введения в яремную вену метка равномерно распределяется по крови в течение 10 мин. К этому моменту в крови крыс остается примерно 10% от введенной метки. Через 20 мин содержание метки в крови крыс падает примерно в три раза по сравнению с первым периодом (за 10 мин), а за следующие 270 мин ещё примерно в два раза. То есть, уже за 10 мин из кровеносного русла успевает перейти в другие ткани крыс около 90% 5-охо-Pro-His-ProNH₂ и продуктов его деградации. В дальнейшем набор меченых продуктов абсорбируется на элементах крови и скорость его выведения из кровеносного русла резко падает. Та же закономерность наблюдается при исследовании изменения содержания 5-охо-Pro-His-ProNH₂ от времени (имеется максимум на 10-й мин, затем происходит резкое падение в крови исходного пептида).

Таким образом, можно констатировать, что меченый пептид, введенный в носовую полость, подвергается деградации быстрее, чем при внутривенном введении. Максимальное количество метки (60-минутная проба),

которое попадает в общий кровоток через слизистую оболочку носа, не превышает 1,5% от исходного количества. В течение 60 мин радиоактивность проб возрастает в 13 раз, затем следует падение к 300-й мин в 6 раз. То есть, скорость вымывания метки и при интраназальном, и при внутривенном способе введения близки. В ходе эксперимента в крови крыс через 5 ч после интраназального введения пептида содержание 5-охо-Pro-His-ProNH₂ снижается практически в 10 раз, тогда как общая радиоактивность в крови уменьшается через 5 ч примерно в 5 раз (табл. 15). Интересно сравнить содержание 5-охо-Pro-His-ProNH₂ в крови крыс при интраназальном и внутривенном введении (табл. 14 и 15). При внутривенном введении в крови крыс содержание 5-охо-Pro-His-ProNH₂ оказалось существенно выше, чем при интраназальном введении.

По тем же методикам была исследована кинетика радиоактивности проб сердца, почек, печени и лёгких крыс, полученных после интраназального и внутривенного введения меченого 5-охо-Pro-His-ProNH₂ (табл. 16, 17). Как видно из приведённых данных, как и при сравнении радиоактивности проб из мозга крыс до и после упаривания, количество ЛФ в пробах из других органов крыс со временем растёт.

Таблица 14. Кинетика изменения радиоактивности проб крови крыс после внутривенного введения меченого 5-охо-Pro-His-ProNH₂

Время, мин	Радиоактивность проб крови крыс в процентах от заведённого количества	Концентрация в крови 5-охо-Pro-His-ProNH ₂ , пмоль/мл
5	7,8* (5,2**)	64,4
10	9,9 (6,0)	74,3
30	3,4 (1,4)	17,2
60	2,9 (0,76)	9,5
120	1,9 (0,33)	4,1
180	1,8 (0,37)	4,6
300	1,6 (0,29)	3,6

Примечание. Изменение радиоактивности проб крови крыс от времени их отбора относительно от заведённого количества в процентах: * – относительно всех тритийсодержащих продуктов; ** – относительно 5-охо-Pro-His-ProNH₂, время – количество минут после введения 5-охо-Pro-His-ProNH₂

Таблица 15. Кинетика изменения радиоактивности проб из крови крыс после интраназального введения меченого 5-охо-Pro-His-ProNH₂

Время, мин	Содержание метки в крови крыс в процентах от заведённого количества	Концентрация в крови 5-охо-Pro-His-ProNH ₂ , пмоль/мл
5	0,11* (0,06**)	0,77
10	0,17 (0,08)	0,98
30	0,36 (0,15)	2,28
60	1,40 (0,48)	6,11
120	0,29 (0,08)	1,01
180	0,24 (0,06)	0,75
300	0,24 (0,05)	0,62

Примечание. Содержание метки в крови крыс, в процентах от заведённого количества: * – относительно всех тритийсодержащих продуктов; ** – относительно 5-охо-Pro-His-ProNH₂.

Таблица 16. Процентное содержание радиоактивности проб из сердца и лёгких крыс (после упаривания экстрактов) относительно радиоактивности до упаривания при интраназальном и внутривенном введении 5-охо-Pro-His-ProNH₂ [52]

Время, мин	Отношение радиоактивности в пробах, %			
	Интраназальное введение		Внутривенное введение	
	Сердце	Лёгкие	Сердце	Лёгкие
5	33,3	13,2	15,4	9,9
30	11,8	9,4	12,7	10,1
60	1,4	6,6	11,4	9,3
120	1,9	9,6	4,5	5,0
300	1,8	12,4	3,9	2,6

Таблица 17. Процентное содержание радиоактивности проб из печени и почек крыс (после упаривания экстрактов) относительно радиоактивности до упаривания при интраназальном и внутривенном введении 5-охо-Pro-His-ProNH₂ [52]

Время, мин	Отношение радиоактивности в пробах, %			
	Интраназальное введение		Внутривенное введение	
	Печень	Почки	Печень	Почки
5	57,3	24,4	19,1	29,7
30	31,9	21,1	18,6	32,5
60	14,2	17,6	8,6	21,9
120	22,0	9,3	5,2	11,7
300	4,9	4,6	2,2	2,7

Таблица 18. Изменение концентрации 5-охо-Pro-His-ProNH₂ в тканях крыс после внутривенного и интраназального введения [52]

Время, мин	Содержание 5-охо-Pro-His-ProNH ₂ в тканях крыс, пмоль/г				
	печень	сердце	почки	лёгкие	мозг
5	1,08* (0,15**)	0,50 (0,14)	62,55 (0,33)	1,56 (0,14)	0,37 (0,031)
30	0,44 (0,20)	0,33 (0,19)	2,53 (1,04)	1,00 (0,21)	0,20 (0,048)
60	0,27 (0,45)	0,26 (0,36)	1,57 (0,16)	0,43 (0,48)	0,15 (0,011)
120	0,20 (0,38)	0,16 (0,21)	1,12 (0,23)	0,26 (0,37)	0,03 (0,009)
300	0,14 (0,33)	0,09 (0,16)	0,19 (0,23)	0,18 (0,26)	0,02(0,006)

Примечание: * – при внутривенном введении; ** – при интраназальном введении метаболитов в пробах, полученных из мозга и крови крыс (рис. 5, 6).

При этом оказалось, что процентное содержание 5-охо-Pro-His-ProNH₂ в перечисленных выше органах крыс при внутривенном введении менее 2%. В то время как радиоактивной метки в этих органах около 40%. Из полученных данных можно сделать вывод, о том, что в органах деградация 5-охо-Pro-His-ProNH₂ идёт более интенсивно, чем в крови.

Так как меченый пептид при интраназальном введении постепенно проникает в другие органы и ткани крыс из носовой полости, то в этих органах и тканях содержание 5-охо-Pro-His-ProNH₂ растёт. Затем процесс его деградации начинает преобладать над его диффузией в данную ткань и количество 5-охо-Pro-His-ProNH₂ начинает уменьшаться (табл. 18). В крови, печени, лёгких и сердце крыс максимальное содержание 5-охо-Pro-His-ProNH₂ наблюдается через 60 мин после введения пептида. В почках и мозге – через 30 мин.

Таким образом, установлено, что, как и в случае других пептидов, при интраназальном введении содержание 5-охо-Pro-His-ProNH₂ во всех исследуемых органах и тканях крыс значительно ниже, чем при внутривенном введении.

Хотя в экспериментах *in vitro* установлено, что единственным метаболитом является 5-охо-Pro-His-Pro, в экспериментах *in vivo* определяли наличие и других метаболитов в пробах, полученных из мозга и крови крыс (рис. 7, 8).

В пробах крови и мозга крыс обнаружены 5-охо-Pro-His, 5-охо-Pro-His-Pro и His-Pro, которые образуются под воздействием пироглутамиламинопептидазы I (PAP I) (КФ 3.4.19.3), пироглутамиламинопептидазы II (PAP II) (КФ 3.4.19.6), пролилэндопептидазы и тиролиберидазы.

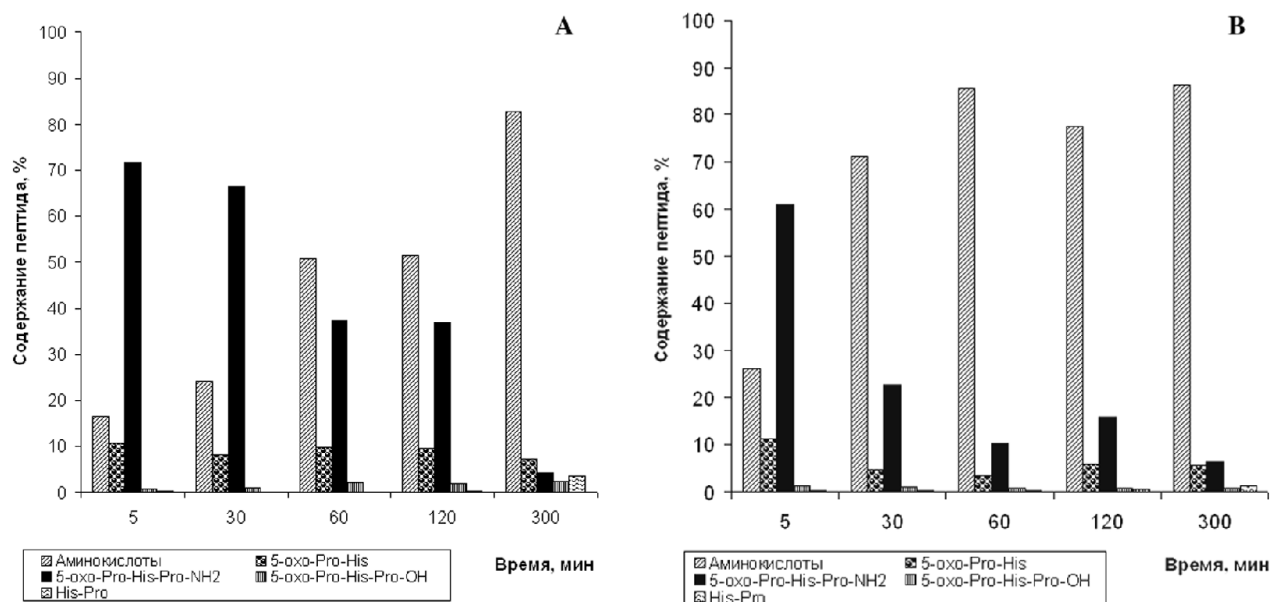
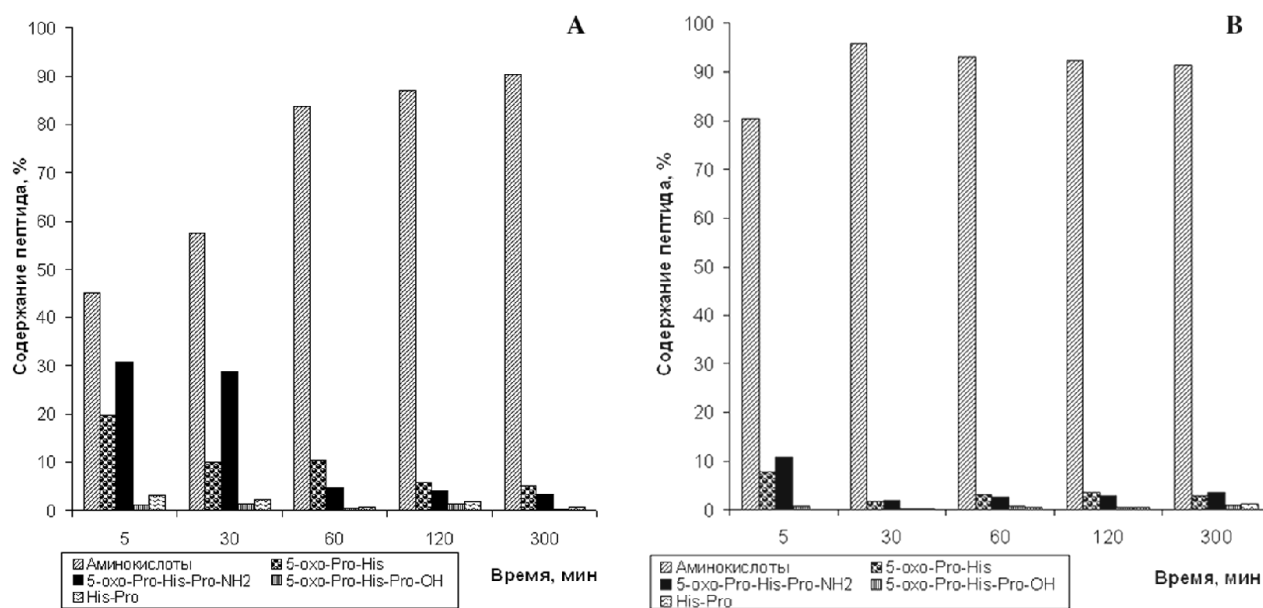
Несмотря на то, что количество 5-охо-Pro-His-ProNH₂ в мозге крыс при внутривенном введении в разы больше, чем при интраназальном введении, его процентное содержание в пробах ниже, чем при интраназальном введении.

В крови крыс, при интраназальном введении, падение содержания 5-охо-Pro-His-ProNH₂ происходит более медленно, чем при внутривенном введении. Возможно, это связано с тем, что при интраназальном введении в кровь 5-охо-Pro-His-ProNH₂ проникает постепенно из носовой полости, и только когда этот источник иссякает, количество 5-охо-Pro-His-ProNH₂ в крови резко падает. В результате при внутривенном введении содержание 5-охо-Pro-His-ProNH₂ падает быстрее, чем при интраназальном введении.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведённый анализ данных показал, что введение пролина в синтетические пептиды увеличивает их стабильность. Особенно это типично для производных Pro-Gly-Pro, а также для различных их модификаций. Для пролонгации действия

УСТОЙЧИВОСТЬ ПРОЛИНСОДЕРЖАЩИХ ПЕПТИДОВ В БИОЛОГИЧЕСКИХ СРЕДАХ



фармакофора Pro-Gly-Pro модифицировали пептиды типа X-Pro-X*-Pro-X** не только в положениях X и X**, но и X*. Полученные таким образом новые биологически активные соединения имели разные биологические свойства и разную устойчивость в биологических средах. Поэтому такого рода исследования являются необходимым этапом в оценке перспективности новых синтезированных пептидов.

Деградация пептидов происходит или под действием протеаз, или за счёт их окисления и дезаминирования. Известно, что включение остатка пролина в пептидные последовательности повышает устойчивость к протеолитическому действию самых распространенных протеаз [56-58]. Например, в работе [59] сообщается о способе стабилизации

синтетических пептидов применением пролиновых остатков (табл. 19).

В перечисленных выше работах [56-59] показано, что пептиды, стабилизированные пролиновыми остатками, были более устойчивы к деградации, чем пептиды, стабилизированные амидированием или ацетилированием, которые обычно применяются, чтобы улучшить устойчивость пептидов.

Но есть пептидазы, которые регулируют уровень пролинсодержащих пептидов в тканях и органах живых организмов. Они специфично и избирательно атакуют пептидные связи пролина с другими аминокислотами. Здесь уместно привести перечень наиболее распространенных пролиновых пептидаз (табл. 20).

Таблица 19. Пептидные связи, устойчивые к протеолитическому действию некоторых распространенных протеаз из-за включения остатка пролина

Протеаза	Пептидная связь (—), обычно расщепляемая, если Pro замещён другой аминокислотой
Трипсин	- (Arg, Lys) — Pro-
Химотрипсин	(Trp, Tyr, Phe, Leu, др.) — Pro-
Термолизин	(аминокислоты) — (гидрофобные) – Pro-
Протеаза <i>Staphylococcus aureus</i>	(Glu, Asp, Gln, Asn) — Pro –
Лейцинаминопептидаза	(гидрофобные) — Pro-
Карбоксипептидазы А и В	(аминокислоты) — Pro
Катепсин В2 (лизосомальная карбоксипептидаза В)	- Pro — аминокислоты

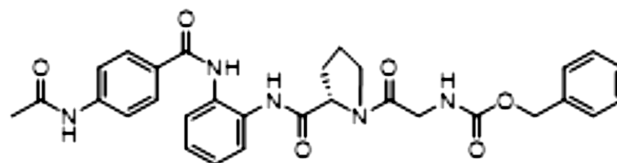
Таблица 20. Некоторые пролиновые пептидазы

Название	Направление протеолиза	Ссылка
Аминопептидаза Р (КФ 3.4.11.9)	N-концевая пептидная связь X-Pro	[60-62]
Пролидаза (пептидаза D, иминопептидаза, КФ 3.4.13.9)	N-ацил аминокислотпролиновые связи, X-Pro связи и C-концевые аминокислоты (пролин, оксипролин) в дипептидах, компонент процесса выведения аминокислот из эритроцитов	[63-65]
Дипептидилпептидаза IV (КФ 3.4.14.5, DPP-IV)	дипептиды от N-концевой пептидной связи (предпоследний остаток пролин или оксипролин) переваривание содержащих пролин пептидов	[66-68]
Дипептидил пептидаза II. (КФ 3.4.14.2, DPP-II)	дипептиды X-Pro от N-концевой пептидной связи, разрушение последовательности X-Pro—Pro в мозге	[69]
Пролиновая эндопептидаза (ПЕРаза, КФ 3.4.21.26)	Pro-Leu связь, Pro-Y связь в ацил-X-Pro—Y и в C-концевом положении	[67]

При изучении устойчивости рассматриваемых в данной работе пептидов оказалось, что при проведении экспериментов *in vivo* наибольшие количества метки теряются при удалении растворителя. Это указывает на то, что, в силу перечисленных причин, связанных с повышенной устойчивостью пролинсодержащих пептидов к ферментативному гидролизу, содержание данных пептидов в живом организме в основном зависит от деградации составляющих пептиды аминокислот [44, 49]. В последнее время появились работы, в которых предприняты попытки использования устойчивости пролинсодержащих пептидов к протеолизу для доставки биологически активного вещества в орган-мишень, то есть непосредственно в те ткани организма, которые необходимо лечить.

Актуальность подобного подхода можно рассмотреть на примере использования доксорубина (Dox), модифицированного пролинсодержащим фрагментом. Известно, что главным ограничивающим фактором применения Dox в противоопухолевой терапии является его кардиотоксичность [70-72]. При использовании Dox отмечены случаи, когда у больных проявлялись симптомы тяжёлой сердечной недостаточности, что может привести даже к смерти пациента [70]. Поэтому до сих пор продолжается поиск производных Dox, которые проявят свои токсические свойства только в опухолях при минимальном ущербе для здоровых тканей организма человека.

Расчёт основывается на том, что в опухолях метаболизм более интенсивен, следовательно, протеолиз связи Dox-Pro в них будет более вероятен. В результате Dox будет высвобождаться только в трансформированных клетках и уничтожать их [73]. Такая методика даст возможность повысить терапевтическую эффективность цитостатических агентов в лечении рака за счёт уменьшения системных побочных эффектов, связанных с высокой токсичностью Dox. Тот же принцип был использован при использовании CI-994 [74], который показывал существенное негативное влияние на развитие широкого спектра различных опухолей [75-77]. Как и в случае с Dox, при клинических испытаниях CI-994 в свободном состоянии вызывает неблагоприятные эффекты [78]. Поэтому для уменьшения этих побочных эффектов использовали CI-994-Pro-Gly-Z:



В этих работах было показано, что в клетках опухолей содержится целый набор ферментов, которые в состоянии разрушать амидные связи лекарства с пролином, недоступные ферментам нормальных клеток.

УСТОЙЧИВОСТЬ ПРОЛИНСОДЕРЖАЩИХ ПЕПТИДОВ В БИОЛОГИЧЕСКИХ СРЕДАХ

Изучение устойчивости пептидов в биологических средах делает возможным расчет дозы и курсов лекарственных препаратов для результативного лечения больных.

Кроме оценки потерь пептидов за счёт их деградации (например, содержание Pro-Gly-Pro-Leu в мозге крыс при интраназальном введении в течение 60 мин падает на 57%, а при внутривенном введении за тот же период количество Pro-Gly-Pro-Leu уменьшается на 76%), важное значение имеет определение содержания и соотношения образующихся метаболитов. Например, в мозге крыс на долю Gly-Pro от общего количества обнаруженных меченых пептидов приходится 69%, на Pro-Gly – 13%, на Gly-Pro-Leu – 10%, на Pro-Gly-Pro-Leu и Pro-Gly-Pro – 4%.

Совокупность метаболитов, образующихся при деградации исходного пептида (пептидов и аминокислот), и их соотношение являются важной информацией при работе с пептидами, так как эти метаболиты могут не уступать в биологической активности исходному пептиду. Например, Gly-Pro, Pro-Gly и Pro-Gly-Pro являются регуляторными пептидами [79-82]. Установлено, что Pro-Gly-Pro и его метаболиты могут проникать через ГЭБ и оказывать влияние на функции мозга [83, 84]. Кроме того, Gly-Pro, Pro-Gly и Pro-Gly-Pro проявляют протекторные эффекты [85-94], защищая слизистую оболочку желудка, и лечебные противоязвенные эффекты.

Информация о распределении пептидов в отделах мозга при внутривенном и интраназальном введении также очень важна, особенно для соединений,

нормализующих деятельность ЦНС. При этом способ введения пептидов часто является ключевым для получения максимального терапевтического эффекта от его действия.

Так, данные о молярных концентрациях пептидов в анализируемых тканях дают возможность рассчитать фармакокинетические параметры (табл. 21), необходимые для использования данного пептида в качестве претендента для применения в медицине.

Расчёт площади (AUC) под фармакокинетическими кривыми [концентрация пептида (пмоль/г) – время (мин)] позволяет оценить по методу [95] вклад прямого (предположительно путём транспорта через нервные окончания обонятельных луковиц) и опосредованного (через кровеносную систему) путей транспорта пептида в мозг, то есть “прямой путь” и “опосредованный путь” проникновения пептида при интраназальном способе введения. Согласно этому методу доля прямого пути может быть определена по следующей формуле:

$$100 \times \left[1 - \frac{AUC_{\text{внутр.мозг}}/AUC_{\text{внутр.кровь}}}{AUC_{\text{интр.мозг}}/AUC_{\text{интр.кровь}}} \right],$$

где $AUC_{\text{внутр.кровь}}$ и $AUC_{\text{внутр.мозг}}$ – значения площади под фармакокинетической кривой (в данном случае – значения AUC) для данных, полученных при внутривенном введении вещества для крови и мозга, соответственно, а $AUC_{\text{интр.кровь}}$ и $AUC_{\text{интр.мозг}}$ – аналогичные показатели, рассчитанные для случая интраназального способа введения вещества.

Таблица 21. Значения фармакокинетических параметров, рассчитанные из данных по внутривенному* и интраназальному** введению пептидов АКТИГ(6-9)PGP, Pro-Gly-Pro-Leu, и 5-охо-Pro-Arg-Pro

Фармакокинетический параметр	АКТИГ(6-9)PGP	Pro-Gly-Pro-Leu	5-охо-Pro-Arg-Pro
D (мкг/кг)	72	200	165
C_{max} (нг/мл)	1,90* (1,0**)	5,37 (0,597)	246,5 (15,9)
T_{max} (мин)	5,0 (120)	2,75 (11,7)	5,1 (28,7)
C₀ (нг/мл)	2,9 (2,13)	339,8 (1,65)	327,4 (71,1)
K_{el} (мин ⁻¹)	0,012 (0,010)	0,14 (0,083)	0,053 (0,014)
T_{1/2,abs} (мин)	5,3 (32,2)	1,51 (7,8)	1,8 (9,9)
T_{1/2,el} (мин)	84,5 (71,4)	19,3 (8,4)	13,1 (48,7)
AUC_{0-∞} (нг/мл×мин)	125 (198)	2428 (18,9)	6188 (1682)
MRT (мин)	108 (131)	21,5 (12,1)	18,9 (70,3)
V1 (мл/кг)	25090 (33830)	589 (121310)	170 (2320)
Vss (мл/кг)	62690 (52460)	1768 (121310)	170 (2319)
Cl (мл/мин×кг)	579 (371)	82,4 (10050)	9,0 (33,0)

Примечание: D – доза вещества; C_{max} – максимальная концентрация вещества в крови; T_{max} – время, соответствующее максимальной концентрации вещества в крови; C₀ – расчётное значение концентрации вещества в крови в начальный момент времени; K_{el} – константа скорости выведения вещества из крови; T_{1/2,abs} – время полубсорбции вещества в кровь; T_{1/2,el} – время полувыведения вещества из крови; AUC_{0-∞} – площадь под фармакокинетической кривой концентрация-время; MRT – среднее время пребывания молекулы фармакологического соединения в крови; V1 – кажущийся объём распределения вещества в центральной камере; Vss – стационарный объём распределения вещества; Cl – общий клиренс.

Проведённый согласно предложенному методу расчёт показал, что, например, для 5-охо-Pro-Arg-Pro $AUC_{\text{внутр.мозг}}/AUC_{\text{внутр.кровь}}$ равен 0,017, а $AUC_{\text{интр.мозг}}/AUC_{\text{интр.кровь}}$ – 0,031. Следовательно, при интраназальном способе введения около 45% этого пептида поступает в мозг путём прямого транспорта, а около 55% – опосредованно, после всасывания в кровь.

По той же методике расчёта процент прямого транспорта АКТГ(6-9)PGP и Pro-Gly-Pro-Leu из носовой полости в мозг крыс при его интраназальном введении оказался примерно одинаков – около 33%.

Таким образом, показано, что как при внутривенном, так и при интраназальном способе введения пептиды способны проникать в мозг. Значительные различия между концентрациями пептидов в крови и мозге при внутривенном введении указывают на их слабую проницаемость через ГЭБ. При интраназальном способе введения различия в концентрациях пептидов в крови и мозге не столь велики, как при внутривенном способе их введения. Количественная оценка вклада двух возможных путей поступления пептидов в мозг из слизистой носовой полости указывает на соизмеримую роль прямого и опосредованного путей транспорта при интраназальном способе введения [44, 49].

По-видимому, это связано с тем, что прямой транспорт фармакологического вещества в мозг не предполагает наличия каких-то барьеров, тогда как опосредованный путь транспорта включает несколько замедляющих доставку вещества в мозг стадий: 1) всасывание вещества в кровь через стенки капилляров; 2) выведение из крови и 3) преодоление ГЭБ.

Следовательно, можно предположить, что прямой путь (возможно, при интраназальном способе введения через нервные окончания обонятельных луковиц) обеспечивает более мощный поток пептида и его метаболитов в мозг, чем опосредованный, однако из-за ферментативного барьера, который предохраняет живой организм от воздействия внешних факторов, в мозг попадает только небольшая его часть.

В целом, приведённые в данном обзоре результаты указывают на перспективность использования интраназального способа введения для эффективной доставки пептидов в головной мозг. Однако совершенно очевидно, что дальнейший прогресс в области практического применения данного подхода требует более глубокого понимания механизмов прямого транспорта пептидов в мозг и установления морфологических структур, участвующих в его реализации.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке программы фундаментальных исследований Президиума РАН “Фундаментальные исследования для разработки биомедицинских технологий”.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ашмарин И.П., Королева С.В., Мясоедов Н.Ф. (2006) Эксп. клин. фармакол., **69**(5), 3-6. [Ashmarin I.P., Koroleva S.V., Myasoedov N.F. (2006) Eksp. i klin. farmakologiya, **69**(5), 3-6.]
2. Ashmarin I.P., Samonina G.E., Lyapina L.A., Kamenskii A.A., Levitskaya N.G., Grivennikov I.A., Dolotov O.V., Andreeva L.A., Myasoedov N.F. (2005) Pathophysiology, **11**(4), 179-185.
3. Bartfai T., Langl U., Hokfelt T. (1994) Neuropept., **26**, 21-28.
4. Foran S.E., Carr D.B., Lipkowski A.W., Maszczyńska I., Marchand J.E., Misicka A., Beinborn M., Kopin A.S., Kream R.M. (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **97**(13), 7621-7626.
5. Kozlovskaya M.M., Kozlovskii I.I., Val'dman E.A., Seredenin S.B. (2003) Neurosci. Behav. Physiol., **33**(9), 853-860.
6. Ашмарин И.П., Алфеева Л.Ю., Андреева Л.А., Гривенников И.А., Дубынин В.А., Каменский А.А., Козловская М.М., Левицкая Н.Г., Мясоедов Н.Ф., Незавибатко В.Н., Середенин С.Б. (2003) Патент РФ № 2206573 (20.06.2003, Бюл. № 17). [Ashmarin I.P., Alfeeva L.Yu., Andreeva L.A., Grivennikov I.A., Dubynin V.A., Kamenskij A.A., Kozlovskaya M.M., Leviczskaya N.G., Myasoedov N.F., Nezavibat'ko V.N., Seredenin S.B. Patent RF № 2206573 (20.06.2003, Byul. №17).]
7. Алфеева Л.Ю., Андреева Л.А., Воронина Т.А., Гузевых Л.С., Емельянова Т.Г., Мясоедов Н.Ф., Середенин С.Б. (2006) Патент РФ № 2286169 (27.10.2006, Бюл. №30). [Alfeeva L.Yu., Andreeva L.A., Voronina T.A., Guzevaty'kh L.S., Emel'yanova T.G., Myasoedov N.F., Seredenin S.B. Patent RF № 2286169 (27.10.2006, Byul. №30).]
8. Андреева Л.А., Мясоедов Н.Ф., Кост Н.В., Мешавкин В.К., Воронина Т.А., Гарибова Т.Л., Середенин С.Б. (2011) Патент РФ № 2411248 (10.02.2011, Бюл. №4). [Andreeva L.A., Myasoedov N.F., Kost N.V., Meshavkin V.K., Voronina T.A., Garibova T.L., Seredenin S.B. Patent RF № 2411248 (10.02.2011, Byul. №4).]
9. Андреева Л.А., Мезенцева М.В., Шаповал И.М., Щербенко В.Э., Ершов Ф.И., Мясоедов Н.Ф. (2011) Патент РФ № 2411249 (10.02.2011, Бюл. №4). [Andreeva L.A., Mezenceva M.V., Shapoval I.M., Shherbenko V.E., Ershov F.I., Myasoedov N.F. Patent RF № 2411249 (10.02.2011, Byul. №4).]
10. Kolomin T., Shadrina M., Slominsky P., Limborska S., Myasoedov N. (2013) Neuroscience Medicine, **4**(4), 223-252.
11. Вьюнова Т.В., Андреева Л.А., Шевченко К.В., Шевченко В.П., Мясоедов Н.Ф. (2016) Нейрохимия, **33**(3), 230-237. [Vyunova T.V., Andreeva L.A., Shevchenko K.V., Shevchenko V.P., Myasoedov N.F. (2016) Neirokhimiya, **33**(3), 230-237.]
12. Шевченко К.В., Андреева Л.А., Нагаев И.Ю., Шевченко В.П. (2015) 6-я Международная конференция “Биологические основы индивидуальной чувствительности к психотропным средствам”. С. 64. [Shevchenko K.V., Andreeva L.A., Nagaev I.Yu., Shevchenko V.P. (2015) 6-ya Mezhdunarodnaya konferentsiya “Biologicheskie osnovy individualnoj chuvstvitelnosti k psikhotropnym sredstvam”, S. 64.]
13. Пономарева-Степная М.А., Бахареv В.Д., Незавибатко В.Н., Андреева Л.А., Алфеева Л.Ю., Потаман В.Н. (1986) Хим. фарм. журн., №6, 667-670. [Ponomareva-Stepnaya M.A., Bakharev V.D., Nezavibatko V.N., Andreeva L.A., Alfeeva L.Yu., Potaman V.N. (1986) Khim. farm. zhurn., №6, 667-670.]

14. Пономарева-Степная М.А., Незавибатько В.Н., Антонова Л.В., Андреева Л.А., Алфеева Л.Ю., Потаман В.Н., Каменский А.А., Ашмарин И.П. (1984) Хим. фарм. журнал, №7, 790-795. [Ponomareva-Stepnaya M.A., Nezavibatkо V.N., Antonova L.V., Andreeva L.A., Alfeeva L.Yu., Potaman V.N., Kamenskij A.A., Ashmarin I.P. (1984) Khim. farm. zhurnal., №7, 790-795.]
15. Ашмарин И.П., Незавибатько В.Н., Мясоедов Н.Ф., Каменский А.А., Гривенников И.А., Пономарева-Степная М.А., Андреева Л.А., Каплан А.А., Кошелев В.Б., Рысина Т.В. (1997) Журн. высш. нервн. деят. им. Павлова И.П., **47**(2), 420-430. [Ashmarin I.P., Nezavibatkо V.N., Myasoedov N.F., Kamenskij A.A., Grivennikov I.A., Ponomareva-Stepnaya M.A., Andreeva L.A., Kaplan A.Ya., Koshelev V.B., Ryasina T.V. (1997) Zhurn. vyssh. nervn. deyat. im. Pavlova I.P., **47**(2), 420-430.]
16. Вьюнова Т.В., Андреева Л.А., Шевченко К.В., Мясоедов Н.Ф. (2018) Тезисы на V съезд фармакологов России "Научные основы поиска и создания новых лекарств". С. 48. [Vyunova T.V., Andreeva L.A., Shevchenko K.V., Myasoedov N.F. (2018) Tezisy na V sezd farmakologov Rossii "Nauchnye osnovy poiska i sozdaniya novykh lekarstv". S.48.]
17. Шевченко К.В., Вьюнова Т.В., Рыбалкина Е.Ю., Андреева Л.А., Нагаев И.Ю., Шевченко В.П., Безуглов В.В., Акимов М.Г., Ушакова Н.А., Мясоедов Н.Ф. (2018) Тезисы на V съезд фармакологов России "Научные основы поиска и создания новых лекарств". С. 270. [Shevchenko K.V., Vyunova T.V., Rybalkina E.Yu., Andreeva L.A., Nagaev I.Yu., Shevchenko V.P., Bezuglov V.V., Akimov M.G., Ushakova N.A., Myasoedov N.F. (2018) Tezisy na V sezd farmakologov Rossii "Nauchnye osnovy poiska i sozdaniya novykh lekarstv". S.270.]
18. Середенин С.Б., Козловская М.М., Бледнов Ю.А., Семенова Т.П., Козловский И.И., Чабак-Горбач Р., Незавибатько В.Н., Мясоедов Н.Ф. (1998) Журн. высш. нервн. деят. им. Павлова И.П., **48**(1), 153-160. [Seredenin S.B., Kozlovskaya M.M., Blednov Yu.A., Semenova T.P., Kozlovskij I.I., Chabak-Gorbach R., Nezavibatkо V.N., Myasoedov N.F. (1998) Zhurn. vyssh. nervn. deyat. im. Pavlova I.P., **48**(1), 153-160.]
19. Кост Н.В., Соколов О.Ю., Габаева М.В., Гривенников И.А., Андреева Л.А., Мясоедов Н.Ф., Зозуля А.А. (2001) Биоорган. химия, **27**(3), 180-183. [Kost N.V., Sokolov O.Yu., Gabaeva M.V., Grivennikov I.A., Andreeva L.A., Myasoedov N.F., Zozulya A.A. (2001) Bioorgan. khimiya., **27**(3), 180-183.]
20. Зозуля А.А., Мешавкин В.К., Торопов А.В., Гуревич К.Г., Кост Н.В. (1999) Бюл. экспер. биол. мед., **127**(2), 211-214. [Zozulya A.A., Meshavkin V.K., Toropov A.V., Gurevich K.G., Kost N.V. (1999) Bull. exper. biol. i med., **127**(2), 211-214.]
21. Соколов О.Ю., Мешавкин В.К., Кост Н.В., Зозуля А.А. (2002) Бюл. экспер. биол. мед., **133**(2), 158-161. [Sokolov O.Yu., Meshavkin V.K., Kost N.V., Zozulya A.A. (2002) Bull. exper. biol. i med., **133**(2), 158-161.]
22. Глазова Н.Ю., Левицкая Н.Г., Андреева Л.А., Каменский А.А., Мясоедов Н.Ф. (1999) Докл. акад. наук. Физиология, **367**(1), 137-140. [Glazova N.Yu., Levitskaya N.G., Andreeva L.A., Kamenskij A.A., Myasoedov N.F. (1999) Dokl. akad. nauk. Fiziologiya, **367**(1), 137-140.]
23. Шевченко К.В., Андреева Л.А., Шевченко В.П., Мясоедов Н.Ф. (2016) Хим. фарм. журнал, **52**(8), 7-11. [Shevchenko K.V., Andreeva L.A., Shevchenko V.P., Myasoedov N.F. (2016) Khim. farm. zhurnal., **52**(8), 7-11]
24. Шевченко В.П., Шевченко К.В., Нагаев И.Ю., Андреева Л.А., Мясоедов Н.Ф. (2018) Тезисы на V съезд фармакологов России "Научные основы поиска и создания новых лекарств". С.270. [Shevchenko V.P., Shevchenko K.V., Nagaev I.Yu., Andreeva L.A., Myasoedov N.F. (2018) Tezisy na V sezd farmakologov Rossii "Nauchnye osnovy poiska i sozdaniya novykh lekarstv". S.48.]
25. Оберган Т.Ю., Шубина Т.А., Григорьева М.Е., Ляпина Л.А., Мясоедов Н.Ф., Андреева Л.А. (2017) Современные проблемы науки и образования, №3, 23-30. [Obergan T.Yu., Shubina T.A., Grigoreva M.E., Lyapina L.A., Myasoedov N.F., Andreeva L.A. (2017) Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya, №3, 23-30.]
26. Ляпина Л.А., Мясоедов Н.Ф., Андреева Л.А., Ульянов А.М., Оберган Т.Ю., Шубина Т.А., Пасторова В.Е. (2010) Изв. РАН. Серия биологическая, №3, 375-379. [Lyapina L.A., Myasoedov N.F., Andreeva L.A., Ulyanov A.M., Obergan T.Yu., Shubina T.A., Pastorova V.E. (2010) Izv. RAN. Seriya biologicheskaya, №3, 375-379.]
27. Андреева Л.А., Ляпина Л.А., Мясоедов Н.Ф., Немерский А.В., Пинелис В.Г., Шрам С.И. (2013) Патент РФ № 2480234 (27.04.2013, Бюл. №12). [Andreeva L.A., Lyapina L.A., Myasoedov N.F., Nemerskiy A.V., Pinelis V.G., Shram S.I. Patent RF № 2480234 (27.04.2013, Bull. №12).]
28. Ляпина Л.А., Андреева Л.А., Ульянов А.М., Оберган Т.Ю., Шубина Т.А., Пасторова В.Е., Мясоедов Н.Ф. (2010) Патент РФ № 2378005 (10.01.2010, Бюл. №1). [Lyapina L.A., Andreeva L.A., Ulyanov A.M., Obergan T.Yu., Shubina T.A., Pastorova V.E., Myasoedov N.F. Patent RF № 2378005 (10.01.2010, Bull. №1).]
29. Ашмарин И.П., Багликова К.Е., Эдеева С.Е., Золотарев Ю.А., Козик В.С., Дадаян А.К., Дорохова Е.М., Алфеева Л.Ю., Андреева Л.А., Копылова Г.Н., Павлов Т.С., Васильевский Б.В., Мешавкин В.К., Соколов О.Ю., Кост Н.В., Зозуля А.А., Самонина Г.Е., Мясоедов Н.Ф. (2008) Биоорган. химия, **34**(4), 464-470. [Ashmarin I.P., Baglikova K.E., Edeeva S.E., Zolotarev Yu.A., Kozik V.S., Dadayan A.K., Dorokhova E.M., Alfeeva L.Yu., Andreeva L.A., Kopylova G.N., Pavlov T.S., Vaskovskij B.V., Meshavkin V.K., Sokolov O.Yu., Kost N.V., Zozulya A.A., Samonina G.E., Myasoedov N.F. (2008) Bioorgan. khimiya, **34**(4), 464-470.]
30. Ульянов А.М., Ляпина Л.А., Шубина Т.А. (2005) Вopr. биол. мед. фарм. химии, №4, 19-21. [Ulyanov A.M., Lyapina L.A., Shubina T.A. (2005) Vopr. biol. med. i farm. khimii, №4, 19-21.]
31. Вьюнова Т.В., Шевченко К.В., Андреева Л.А., Шевченко В.П., Радилов А.С., Дулов С.А., Петунов С.Г., Мясоедов Н.Ф. (2017) Хим. фарм. журнал, **51**(5), 9-12. [Vyunova T.V., Shevchenko K.V., Andreeva L.A., Shevchenko V.P., Radilov A.S., Dulov S.A., Petunov S.G., Myasoedov N.F. (2017) Khim. farm. zhurnal, **51**(5), 9-12.]
32. Шевченко К.В., Вьюнова Т.В., Нагаев И.Ю., Андреева Л.А., Мясоедов Н.Ф. (2013) Биоорган. химия, **39**(3), 320-325. [Shevchenko K.V., Vyunova T.V., Nagaev I.Yu., Andreeva L.A., Myasoedov N.F. (2013) Bioorgan. khimiya, **39**(3), 320-325.]
33. Шевченко К.В., Вьюнова Т.В., Андреева Л.А., Нагаев И.Ю., Шевченко В.П., Мясоедов Н.Ф. (2015) Хим. фарм. журнал, **49**(2), 12-17. [Shevchenko K.V., Vyunova T.V., Andreeva L.A., Nagaev I.Yu., Shevchenko V.P., Myasoedov N.F. (2015) Khim. farm. zhurnal, **49**(2), 12-17.]
34. Вьюнова Т.В., Андреева Л.А., Шевченко К.В., Шевченко В.П., Бобров М.Ю., Безуглов В.В., Мясоедов Н.Ф. (2008) Докл. акад. наук, **419**(1), 136-137. [Vyunova T.V., Andreeva L.A., Shevchenko K.V., Shevchenko V.P., Bobrov M.Yu., Bezuglov V.V., Myasoedov N.F. (2008) Dokl. akad. nauk, **419**(1), 136-137.]

35. Шевченко К.В., Дулов С.А., Андреева Л.А., Нагаев И.Ю., Шевченко В.П., Радилов А.С., Мясоедов Н.Ф. (2016) Биоорган. химия, **42**(2), 171-181. [Shevchenko K.V., Dulov S.A., Andreeva L.A., Nagaev I.Yu., Shevchenko V.P., Radilov A.S., Myasoedov N.F. (2016) Bioorgan. khimiya, **42**(2), 171-181.]
36. Шевченко К.В., Радилов А.С., Андреева Л.А., Нагаев И.Ю., Шевченко В.П., Рембовский В.Р., Мясоедов Н.Ф. (2015) Тезисы на VII Российском симпозиуме "Белки и пептиды". С. 431. [Shevchenko K.V., Radilov A.S., Andreeva L.A., Nagaev I.Yu., Shevchenko V.P., Rembovskij V.R., Myasoedov N.F. (2015) Tezisy na VII Rossijskom simpoziume "Belki i peptidy". S.431.]
37. Шевченко В.П., Нагаев И.Ю., Мясоедов Н.Ф. (2003) Меченные тритием липофильные соединения. М.: Наука. 246 С. [Shevchenko V.P., Nagaev I.Yu., Myasoedov N.F. (2003) Mechennnye tritiem lipofilnye soedineniya. M.: Nauka. 246 S.]
38. Шевченко В.П., Радилов А.С., Нагаев И.Ю., Шевченко К.В., Рембовский В.Р., Мясоедов Н.Ф. (2015) Радиохимия, **57**(5), 463-465. [Shevchenko V.P., Radilov A.S., Nagaev I.Yu., Shevchenko K.V., Rembovskij V.R., Myasoedov N.F. (2015) Radiokhimiya, **57**(5), 463-465.]
39. Шевченко В.П., Нагаев И.Ю., Шевченко К.В., Мясоедов Н.Ф. (2013) Радиохимия, **55**(3), 284-288. [Shevchenko V.P., Nagaev I.Yu., Shevchenko K.V., Myasoedov N.F. (2013) Radiokhimiya, **55**(3), 284-288.]
40. Шевченко В.П., Нагаев И.Ю., Андреева Л.А., Мясоедов Н.Ф. (2017) Докл. акад. наук, **473**(5), 564-567. [Shevchenko V.P., Nagaev I.Yu., Andreeva L.A., Myasoedov N.F. (2017) Dokl. akad. nauk, **473**(5), 564-567.]
41. Шевченко В.П., Нагаев И.Ю., Петунов С.Г., Шевченко К.В., Радилов А.С., Мясоедов Н.Ф. (2015) Докл. акад. наук, **464**(5), 562-567. [Shevchenko V.P., Nagaev I.Yu., Petunov S.G., Shevchenko K.V., Radilov A.S., Myasoedov N.F. (2015) Dokl. akad. nauk, **464**(5), 562-567.]
42. Шевченко К.В., Вьюнова Т.В., Андреева Л.А., Шевченко В.П., Мясоедов Н.Ф. (2013) Тезисы на VI Российском симпозиуме "Белки и пептиды". С. 173. [Shevchenko K.V., Vyunova T.V., Andreeva L.A., Shevchenko V.P., Myasoedov N.F. (2013) Tezisy na VI Rossijskom simpoziume "Belki i peptidy". S.173.]
43. Шевченко К.В., Вьюнова Т.В., Андреева Л.А., Нагаев И.Ю., Шевченко В.П., Мясоедов Н.Ф. (2014) Бюлл. экспер. биол. мед., **158**(7), 43-48. [Shevchenko K.V., Vyunova T.V., Andreeva L.A., Nagaev I.Yu., Shevchenko V.P., Myasoedov N.F. (2014) Bull. exper. biol. med., **158**(7), 43-48.]
44. Шевченко К.В., Вьюнова Т.В., Андреева Л.А., Нагаев И.Ю., Шевченко В.П., Мясоедов Н.Ф. (2014) Докл. акад. наук, **456**(5), 613-617. [Shevchenko K.V., Vyunova T.V., Andreeva L.A., Nagaev I.Yu., Shevchenko V.P., Myasoedov N.F. (2014) Dokl. akad. nauk, **456**(5), 613-617.]
45. Давтян М.А., Айрапетян Н.Н. (1998) Биолог. журн. Армении, **51**(1-2), 3-6. [Davtyan M.A., Ajrapetyan N.N. (1998) Biolog. zhurn. Armenii, **51**(1-2), 3-6.]
46. Blanchard M., Green D.E., Nocito V., Ratner S. (1944) J. Biol. Chem. **155**(2), 421-440.
47. Шевченко К.В., Нагаев И.Ю., Шевченко В.П., Андреева Л.А., Шрам С.И. (2017) Тезисы на VIII Российском симпозиуме "Белки и пептиды". С. 26. [Shevchenko K.V., Nagaev I.Yu., Shevchenko V.P., Andreeva L.A., Shram S.I. (2017) Tezisy na VI Rossijskom simpoziume "Belki i peptidy". S.167.]
48. Нагаев И.Ю., Шевченко В.П., Шевченко К.В., Андреева Л.А., Шрам С.И., Мясоедов Н.Ф. (2018) Тезисы на V съезде фармакологов России "Научные основы поиска и создания новых лекарств". С. 167. [Nagaev I.Yu., Shevchenko V.P., Shevchenko K.V., Andreeva L.A., Shram S.I., Myasoedov N.F. (2018) Tezisy na V sezd farmakologov Rossii "Nauchnye osnovy poiska i sozdaniya novykh lekarstv". S.167.]
49. Шевченко К.В., Нагаев И.Ю., Бабаков В.Н., Андреева Л.А., Шевченко В.П., Радилов А.С., Мясоедов Н.Ф. (2015) Докл. акад. наук, **464**(3), 373-376. [Shevchenko K.V., Nagaev I.Yu., Babakov V.N., Andreeva L.A., Shevchenko V.P., Radilov A.S., Myasoedov N.F. (2015) Dokl. akad. nauk, **464**(3), 373-376.]
50. Шевченко К.В., Андреева Л.А., Нагаев И.Ю., Шевченко В.П., Мясоедов Н.Ф. (2015) II Научная конференция "Физиологическая активность регуляторных пептидов" посвящённая 90-летию со дня рождения академика РАМН Игоря Петровича Ашмарина. С. 45. [Shevchenko K.V., Andreeva L.A., Nagaev I.Yu., Shevchenko V.P., Myasoedov N.F. (2015) II Nauchnaya konferentsiya "Fiziologicheskaya aktivnost regulatorynykh peptidov" posvyashchennaya 90-letiyu so dnya rozhdeniya akademika RAMN Igorya Petrovicha Ashmarina. Moskva. S.45.]
51. Шевченко К.В., Нагаев И.Ю., Шевченко В.П., Андреева Л.А., Шрам С.И., Мясоедов Н.Ф. (2017) Докл. акад. наук, **473**(3), 742-745. [Shevchenko K.V., Nagaev I.Yu., Shevchenko V.P., Andreeva L.A., Shram S.I., Myasoedov N.F. (2017) Dokl. akad. nauk, **473**(3), 742-745.]
52. Шевченко К.В., Вьюнова Т.В., Радилов А.С., Андреева Л.А., Нагаев И.Ю., Шевченко В.П., Рембовский В.Р., Мясоедов Н.Ф. (2015) Тезисы на VII Российском симпозиуме "Белки и пептиды". С. 430. [Shevchenko K.V., Vyunova T.V., Radilov A.S., Andreeva L.A., Nagaev I.Yu., Shevchenko V.P., Rembovskij V.R., Myasoedov N.F. (2015) Tezisy na VII Rossijskom simpoziume "Belki i peptidy". S.430.]
53. Шевченко К.В., Вьюнова Т.В., Радилов А.С., Андреева Л.А., Нагаев И.Ю., Шевченко В.П., Рембовский В.Р., Мясоедов Н.Ф. (2015) Докл. акад. наук, **465**(6), 749-752. [Shevchenko K.V., Vyunova T.V., Radilov A.S., Andreeva L.A., Nagaev I.Yu., Shevchenko V.P., Rembovskij V.R., Myasoedov N.F. (2015) Dokl. akad. nauk, **465**(6), 749-752.]
54. Furubayashi T., Kamaguchi A., Kawaharada K., Masaoka Y., Kataoka M., Yamashita S., Higashi Y., Sakane T. (2007) Biol. Pharm. Bull. **30**(5), 1007-1010.
55. Привалова А.М., Гуляева Н.В., Букреева Т.В. (2012) Нейрохимия, **29**(2), 93-105. [Privalova A.M., Gulyaeva N.V., Bukreeva T.V. (2012) Neirokhimiya, **29**(2), 93-105.]
56. Walter R., Simmons W.H., Yoshimoto T. (1980) Mol. Cell Biochem., **30**(2), 111-127.
57. McDonald J.K., Barrett A.J. (1986) Mammalian Proteases: A Glossary and Bibliography Vol. 2. Exopeptidases. London. Academic Press. 357 P.
58. Mentlein R. (1988) FEBS Lett., **234**(2), 251-256.
59. Walker J.R., Altman R.K., Warren J.W., Altman E. (2003) J. Pept. Res., **62**(5), 214-226.
60. Hooper N.M., Htyszko J., Turner A.J. (1990) Biochem. J., **267**(2), 509-515.
61. Fleminger G., Yaron A. (1984) Biochim. Biophys. Acta., **789**(3), 245-256.
62. Lin L.N., Brandts J.F. (1979) Biochemistry, **18**(23), 5037-5042.
63. Yaron A., Naider F. (1993) Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol., **28**(1), 31-81.
64. Lin L.N., Brandts J.F. (1979) Biochemistry, **18**(1), 43-47.
65. King G.F., Kuchel P.W. (1984) Biochem. J., **220**(2), 553-560.

66. Kenny A.J., Booth A.G., George S.G., Ingram J., Kershaw D., Wood E.J., Young A.R. (1976) *Biochem. J.*, **157**(1), 169-182.
67. Heins J., Welker P., Schonlein C., Born I., Hartrodt B., Neubert K., Tsuru D., Barth A. (1988) *Biochim. Biophys. Acta.*, **954**(2), 161-169.
68. Morita A., Chung Y.C., Freeman H.J., Erickson R.H., Sleisinger M.H., Kim Y.S. (1983) *J. Clin. Invest.*, **72**(2), 610-616.
69. Mentlein R., Struckhoff G. (1989) *J. Neurochem.*, **52**(4), 1284-1293.
70. Семенова А.И. (2009) *Практическая онкология*, **10**(3), 168-176. [Semenova A.I. (2009) *Prakticheskaya onkologiya*, **10**(3), 168-176.]
71. Minotti G., Menna P., Salvatorelli E., Cairo G., Gianni L. (2004) *Pharmacol. Rev.*, **56**(2), 185-229.
72. Octavia Y., Tocchetti C.G., Gabrielson K.L., Janssens S., Crijns H.J., Moens A.L. (2012) *J. Mol. Cell. Cardiol.*, **52**(6), 1213-1225.
73. Huang S., Fang R., Xu J., Qiu S., Zhang H., Du J., Cai S. (2011) *J. Drug Target.*, **19**(7), 487-496.
74. Deng Y., Gao P., Guo C., Wu L., Xu J., Chen H., Cai Sh. (2013) *Med. Chem.*, **3**(2), 199-205.
75. el-Beltagi H.M., Martens A.C., Lelieveld P., Haroun E.A., Hagenbeek A. (1993) *Cancer Res.*, **53**(13), 3008-3014.
76. LoRusso P.M., Demchik L., Foster B., Knight J., Bissery M.C., Polin L.M., Leopold W.R. 3rd, Corbett T.H. (1996) *Invest. New Drugs*, **14**(4), 349-356.
77. Seelig M.H., Berger M.R. (1996) *Eur. J. Cancer*, **32A**(11), 1968-1976.
78. Thomas M., Clarhaut J., Tranoy-Opalinski I., Gesson J.P., Roche J., Papot S. (2008) *Bioorg. Med. Chem.*, **16**(17), 8109-8116.
79. Pires A., Fortuna A., Alves G., Falcao A. (2009) *J. Pharm. Pharmacut. Sci.*, **12**(3), 288-311.
80. Costantino H.R., Illum L., Brandt G., Johnson P.H., Quay S.C. (2007) *Int. J. Pharm.*, **337**(1-2), 1-24.
81. Sarkar M.A. (1992) *Pharm. Res.*, **9**(1), 1-9.
82. Wong Y.C., Zuo Z. (2010) *Pharm. Res.*, **27**(7), 1208-1223.
83. Ашмарин И.П., Каменский А.А., Ляпина Л.А., Мясоедов Н.Ф., Самонина Г.Е. (2002) *Вопр. биол. мед. фарм. химии*, №1, 24-27. [Ashmarin I.P., Kamenskij A.A., Lyapina L.A., Myasoedov N.F., Samonina G.E. (2002) *Vopr. biol. med. i farm. khimii*, №1, 24-27.]
84. Haddox J.L., Pfister R.R., Muccio D.D., Villain M., Sommers C.I., Chaddha M., Anantharamaiah G.M., Brouillette W.J., DeLucas L.J. (1999) *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **40**(10), 2427-2429.
85. Бадмаева К.Е., Самонина Г.Е., Васильковский Б.В., Платонова Р.Д. (2004) *Вестник Московского университета, Сер. 16. Биология*, №4, 7-9. [Badmaeva K.E., Samonina G.E., Vaskovskij B.V., Platonova R.D. (2004) *Vestnik Moskovskogo universiteta, Ser. 16. Biologiya*, №4, 7-9.]
86. Бакаева З.В., Самонина Г.Е., Андреева Л.А., Золотарев Ю.А., Козик В.А., Ашмарин И.П., Мясоедов Н.Ф. (2004) *Эксп. клин. фармакол.*, **67**, 72-75. [Bakaeva Z.V., Samonina G.E., Andreeva L.A., Zolotarev Yu.A., Kozik V.A., Ashmarin I.P., Myasoedov N.F. (2004) *Exp. i klin. farmakologiya*, **67**, 72-75.]
87. Васильковский Б.В., Золотарев Ю.А., Жуикова С.Е., Самонина Г.Е., Ашмарин И.П., Мясоедов Н.Ф., Ляпина Л.А., Пасторова В.Е., Бакаева З.В. (2003) *Вопр. биол. мед. и фарм. химии*, №3, 41-45. [Vaskovskij B.V., Zolotarev Yu.A., Zhujkova S.E., Samonina G.E., Ashmarin I.P., Myasoedov N.F., Lyapina L.A., Pastorova V.E., Bakaeva Z.V. (2003) *Vopr. biol. med. i farm. khimii*, №3, 41-45.]
88. Золотарев Ю.А., Жуикова С.Е., Ашмарин И.П., Мясоедов Н.Ф., Васильковский Б.В., Самонина Г.Е. (2003) *Бюл. экспер. биол. мед.*, **135**(4), 423-426. [Zolotarev Yu.A., Zhujkova S.E., Ashmarin I.P., Myasoedov N.F., Vaskovskij B.V., Samonina G.E. (2003) *Bull. exper. biol. med.*, **135**(4), 423-426.]
89. Абрамова М.А., Самонина Г.Е., Ашмарин И.П. (1996) *Нейрохимия*, **13**(3), 209-214. [Abramova M.A., Samonina G.E., Ashmarin I.P. (1996) *Neirokhimiya*, **13**(3), 209-214.]
90. Ашмарин И.П., Самонина Г.Е., Желязник Н.Я., Бакаева З.В. (1999) *Докл. акад. наук*, **368**(5), 709-710. [Ashmarin I.P., Samonina G.E., Zhelyaznik N.Ya., Bakaeva Z.V. (1999) *Dokl. akad. nauk*, **368**(5), 709-710.]
91. Копылова Г.Н., Бадмаева С.Е., Левицкая Н.Г., Самонина Г.Е., Умарова Б.А., Гусева А.А. (2004) *Бюл. экспер. биол. мед.*, **137**(7), 9-12. [Kopylova G.N., Badmaeva S.E., Levitskaya N.G., Samonina G.E., Umarova B.A., Guseva A.A. (2004) *Bull. exper. biol. med.*, **137**(7), 9-12.]
92. Samonina G.E., Lyapina L.A., Kopylova G.N., Pastorova V.E., Bakaeva Z.V., Jeliyaznik N., Zuykova S.E., Ashmarin I.P. (2000) *Pathophysiology*, **7**(1), 69-73.
93. Samonina G.E., Ashmarin I.P., Lyapina L.A. (2002) *Pathophysiology*, **8**(4), 229-234.
94. Жуикова С.Е., Бадмаева К.Е., Самонина Г.Е., Плесская Л.Г. (2003) *Эксп. клин. гастроэнтерол.*, №4, 88-92. [Zhujkova S.E., Badmaeva K.E., Samonina G.E., Plesskaya L.G. (2003) *Exp. i klin. gastroenterologiya*, №4, 88-92.]
95. Charlton S.T., Whetstone J., Fayinka S.T., Read K.D., Illum L., Davis S.S. (2008) *Pharm. Res.*, **25**(7), 1531-1543.

Поступила в редакцию: 31. 01. 2019.
После доработки: 16. 02. 2019.
Принята к печати: 20. 02. 2019.

STABILITY OF PROLIN-CONTAINING PEPTIDES IN BIOLOGICAL MEDIA

K.V. Shevchenko, I.Yu. Nagaev, L.A. Andreeva, V.P. Shevchenko, N.F. Myasoedov*

Institute of Molecular Genetics of the Russian Academy of Sciences,
2 Kurchatov sq., Moscow 123182 Russia; *e-mail: ATCarma@mail.ru

New data on peptide drugs have been summarized; their high stability is due to both the introduction of Pro-Gly-Pro in various amino acid sequences and the modification of the glyproline fragment itself. Pro-Gly-Pro-Leu, ACTH(6-9)Pro-Gly-Pro, 5-oxo-Pro-Arg-Pro and 5-oxo-Pro-His-Pro-NH₂ were used as proline-containing peptides. Tritiated peptides were obtained: Pro-Gly-Pro-Leu with specific radioactivity of 135 Ci/mmol, ACTH(6-9)Pro-Gly-Pro – 26 Ci/mmol, 5-oxo-Pro-Arg-Pro – 60 Ci/mmol and 5-oxo-Pro-His-Pro-NH₂ – 75 Ci/mmol. The concentration of Pro-Gly-Pro-Leu, ACTH(6-9)Pro-Gly-Pro, 5-oxo-Pro-Arg-Pro and 5-oxo-Pro-His-Pro-NH₂ in the blood was found to be about 200 times more than in the brain for intranasal administration, and in average 600 times more for intravenous administration. The stability of proline-containing peptides in vitro experiments was determined using different commercially available peptidases (leucine aminopeptidases, dipeptidases, carboxypeptidases B and Y), and using nasal mucus, microsomal fraction of the rat brain (IMPC) and rat blood plasma. During peptidase hydrolysis of Pro-Gly-Pro-Leu, the main metabolites were Gly-Pro-Leu, Pro-Gly-Pro, Gly-Pro and Pro-Gly. For ACTH(6-9)Pro-Gly-Pro, the main metabolites were Phe-Arg-Trp-Pro-Gly-Pro and Trp-Pro-Gly-Pro. In peptidase hydrolysis of 5-oxo-Pro-His-Pro-NH₂, the major metabolite was 5-oxo-Pro-His-Pro. It was shown that with different methods of peptides administration the composition of the metabolites formed is different. Based on the data obtained, resistance to enzymatic cleavage of peptides and their metabolic pathways were evaluated. Thus, these new data have shown that the above approaches can be used to prolong the action of glyprolines in living objects. In this case, the degradation of proline-containing peptides occurs mainly not due to the action of proteases, but due to other ways of degradation. In general, the data presented in the review indicate the promise of intranasal way of introducing biologically active peptides into the brain of living organisms.

Key words: peptides; proteolysis; methods of administration; tritium-labeled analogs; distribution in organs

Funding. The work was supported by the program of basic research of the Presidium of the Russian Academy of Sciences “Basic research for the development of biomedical technologies”.

Received: 31.01.2019, revised: 16.02.2019, accepted: 20.02.2019.