

Комплексный протеомный анализ «легкой» пептидной фракции препарата Церебролизин

© О.А. ГРОМОВА^{1,2}, И.Ю. ТОРШИН^{1,2}, В.Г. ЗГОДА³, О.В. ТИХОНОВА³

¹ФГБУ «Федеральный исследовательский центр «Информатика и управление» Российской академии наук», Институт фармакоинформатики, Москва, Россия;

²Центр хранения и анализа больших данных, ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова», Москва, Россия;

³ФГБНУ «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича», Москва, Россия

Резюме

Цель исследования. Проведение комплексного протеомного анализа пептидного состава «легкой» пептидной фракции лекарственного препарата (ЛП) Церебролизин.

Материал и методы. Гибридная масс-спектрометрия (МС) с орбитальными ловушками ионов с последующим использованием современных алгоритмов *de novo* МС-секвенирования.

Результаты. Установлены аминокислотные последовательности 14 635 пептидов, соответствующих 1643 нейрональным белкам протеома свиньи. Анализ аннотации протеома человека показал, что выявленные пептиды ЛП Церебролизин могут являться пептидами-миметиками соответствующих пептидов человека. В частности, найдено 405 пептидных фрагментов, соответствующих 300 известным биологически активным пептидам, в том числе фрагментам антибактериальных (дефензины, гистатины), иммуномодуляторных (гранулин, мансерин) и вазоактивных (эндотелин, VIP) пептидов. При этом 8953 из 14 635 пептидов могут являться модуляторами активности 275 сигнальных белков человека, в том числе ингибировать киназы CDK1, CDK2, TGFBR2, GSK3, MTOR, проапоптотические ферменты-каспазы CASP1, CASP3 и CASP6 и др. Результаты исследования подтвердили наличие в составе ЛП Церебролизин Leu- и Met-энкефалинов, фрагментов нейропептидов орексина, нейропептида VF, галанина и фактора роста нервов, оказывающих нейротрофическое действие.

Заключение. Результаты протеомного исследования пептидного состава ЛП Церебролизин указывают на широчайший круг молекулярных механизмов, обуславливающих его фармакологическое действие.

Ключевые слова: Церебролизин, протеомика, масс-спектрометрия, секвенирование *de novo*, алгоритмы анализа больших данных.

Сведения об авторах:

Громова Ольга Алексеевна — e-mail: unesco.gromova@gmail.com; <https://orcid.org/0000-0002-7663-710X>

Торшин Иван Юрьевич — <https://orcid.org/0000-0002-2659-7998>

Згода Виктор Гаврилович — e-mail: victor.zgoda@gmail.com; <https://orcid.org/0000-0002-4532-4274>

Тихонова Ольга Валентиновна — e-mail: ovt.facility@gmail.com; <https://orcid.org/0000-0002-2810-566X>

Как цитировать:

Громова О.А., Торшин И.Ю., Згода В.Г., Тихонова О.В. Комплексный протеомный анализ «легкой» пептидной фракции препарата Церебролизин. *Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова*. 2019;119(8):75-83. <https://doi.org/10.17116/jnevro201911908175>

An analysis of the peptide composition of a «light» peptide fraction of Cerebrolysin

© О.А. GROMOVA^{1,2}, I.YU. TORSHIN^{1,2}, V.G. ZGODA³, O.V. TIKHONOVA³

¹Federal Research Center «Computer Science and Control» of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia;

²Big Data Storage and Analysis Center, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia;

³Orekhovich Research Institute of Biomedical Chemistry, Moscow, Russia

Abstract

Objective. To analyze the peptide composition of a light peptide fraction of cerebrolysin.

Material and methods. Mass spectrometry (MS) with orbital ion traps and modern *de novo* MS-sequencing algorithms was performed.

Results. The amino acid sequences of 14 635 peptides corresponding to the 1643 porcine proteome neuronal proteins are identified. An analysis of the human proteome annotation shows that these peptides can mimic the corresponding human peptides. In particular, 405 peptide fragments correspond to 300 known biologically active peptides, including fragments of antibacterial pep-

Автор для корреспонденции: Громова Ольга Алексеевна — e-mail: unesco.gromova@gmail.com

Corresponding author: Gromova O.A. — e-mail: unesco.gromova@gmail.com

tides (defensins, histatins), immunomodulatory (granulin, manserin) and vasoactive (endothelin, VIP) peptides. At the same time, 8953 of 14 635 peptides can modulate the activity of 275 human signaling proteins, including kinases CDK1, CDK2, TGFBR2, GSK3, MTOR, pro-apoptotic caspases CASP1, CASP3 and CASP6 etc. The results confirm the presence of Leu- and Met-enkephalins, fragments of neuropeptide orexin, neuropeptide VF, galanin and nerve growth factor that have a neurotrophic effect.

Conclusion. The results of a proteomic study of the peptide composition of cerebrolysin indicate the widest range of molecular mechanisms responsible for the clinical efficacy of this drug.

Keywords: Cerebrolysin, proteomics, mass-spectrometry, de novo sequencing, algorithms for big data analysis.

Information about authors:

Gromova O.A. — e-mail: unesco.gromova@gmail.com; <https://orcid.org/0000-0002-7663-710X>

Torshin I.Yu. — <https://orcid.org/0000-0002-2659-7998>

Zgoda V.G. — e-mail: victor.zgoda@gmail.com; <https://orcid.org/0000-0002-4532-4274>

Tikhonova O.V. — e-mail: ovt.facility@gmail.com; <https://orcid.org/0000-0002-2810-566X>

To cite this article:

Gromova OA, Torshin IYu, Zgoda VG, Tikhonova OV. An analysis of the peptide composition of a «light» peptide fraction of Cerebrolysin. *S.S. Korsakov Journal of Neurology and Psychiatry = Zhurnal Nevrologii i psikiatrii im. S.S. Korsakova*. 2019;119(8):75-83. (In Russ.). <https://doi.org/10.17116/jnevro201911908175>

Лекарственный препарат (ЛП) Церебролизин, изготавливаемый на основе пептидного экстракта мозга молодых свиней, проявляет нейротрофический и нейропротективный эффекты, важные для восстановления пациентов после ишемического инсульта (ИИ) и терапии деменции [1]. Экспериментальные исследования указали на нейротрофический [2], нейропротективный [3], ноотропный [4, 5], противоболевой и противовоспалительный [6], антиконвульсантный [7] и противоопухолевый [8] эффекты ЛП Церебролизин. Клинические исследования показали эффективность и безопасность использования ЛП Церебролизин для терапии острого ИИ [9], после черепно-мозговых травм (ЧМТ) и субарахноидальных кровоизлияний [10], при когнитивных нарушениях [11] и расстройствах аутистического спектра [12], а также подтвердили противовоспалительный и антиоксидантный эффекты [13]. Метаанализы клинических исследований подтвердили целесообразность применения ЛП Церебролизин в терапии острого ИИ [14], болезни Альцгеймера умеренной тяжести [15] и ЧМТ [16].

Клиническая эффективность ЛП Церебролизин обусловлена особенностями его пептидного состава. Сравнительное экспериментальное исследование нескольких нейропептидных экстрактов животного происхождения показало, что только ЛП Церебролизин способствовал улучшению результатов неврологического тестирования в модели ИИ [17]. Нейропластическое действие препарата обусловлено воздействием на нейрональную сигнальную систему фактора роста нервов (ФРН) [18], что отчасти подтверждается результатами нейробиологических исследований [19]. Анализ пептидного состава препарата, проведенные ранее с использованием стандартных процедур секвенирования белков, указали на наличие в его составе пептидных фрагментов энкефалинов [20], ФРН, орексина, галанина и др. [21].

Таким образом, получение максимально полной информации о пептидном составе представляет собой одно из важнейших направлений фундаментальных исследований ЛП Церебролизин. Опубликованная к настоящему времени информация о пептидах ЛП Церебролизин заведомо неполна. Например, полученный ранее масс-спектр ЛП Церебролизин указал на наличие в его составе десятков ты-

сяч пептидов в диапазоне масс 200—6000 Да с максимальным количеством пептидов в сравнительно «легкой» пептидной фракции (до 1500 Да) [20]. Поэтому для комплексного анализа пептидного состава ЛП Церебролизин следует использовать высокоточную масс-спектрометрию (МС) с микросеквенированием выделяемых пептидов.

Попытка проведения такого анализа ЛП Церебролизин была предпринята ранее [22]. Однако данную работу отличает несколько особенностей, которые нельзя не подчеркнуть. Во-первых, авторы приобрели образцы ЛП Церебролизин в интернет-магазине, не у лицензированного дистрибьютора препарата (в том числе аптека) и не у фирмы-производителя. Следовательно, нельзя исключить того, что в работе [22] изучался не сам ЛП Церебролизин, а контрафактное изделие.

Во-вторых, в работе утверждается, что методом *de novo*-секвенирования (программный пакет PEAKS) были установлены последовательности 638 пептидов. Такое весьма малое количество пептидов — довольно странный результат для масштабного протеомного исследования, в котором изучаются десятки тысяч пептидных фрагментов. Чрезвычайно малое количество пептидов указывает на крайне низкую эффективность использованных в работе процедур анализа МС-данных [22].

В-третьих, приводимые примеры аминокислотных последовательностей пептидов подтверждают сделанное выше предположение о возможной контрафактности исследованных авторами [22] образцов. Авторы утверждают, что не нашли в исследованных ими образцах никаких пептидных фрагментов ростовых факторов, а нашли преимущественно фрагменты тубулина, актина и основного миелинового белка. Поэтому, как отметили и сами авторы работы, полученные ими результаты указывают на проблемы, связанные в большей мере с приобретением лекарств по Интернету, чем на пептидный состав ЛП Церебролизин. Тем не менее данная статья является фактически единственной опубликованной ранее работой, в которой заявляется о применении современных методов протеомики к анализу ЛП Церебролизин.

Цель исследования — проведение МС-исследования пептидного состава ЛП Церебролизин с использованием одной из передовых технологий современной протеомики

— гибридного масс-спектрометра, соединяющего в себе возможности хроматографического выделения ионов и многомерного МС-анализа.

Материал и методы

В ходе исследования был изучен состав образцов пептидной фракции ЛП Церебролизин трех различных серий (серия B4RF1A, дата выпуска 06.2018; серия PB2298, дата выпуска 06.2014; серия A4AB1A, дата выпуска 02.2015), приобретенных в государственных аптеках Москвы. Все образцы были с действующим сроком годности, выпущены в течение 4 последних лет и изучены при различных условиях протеомного эксперимента. В целом было проведено 10 независимых протеомных МС-экспериментов.

Процесс экспериментального исследования пептидного состава ЛП Церебролизин состоял из трех основных этапов: очистки препарата, хроматографического разделения пептидов и МС-анализа пептидной фракции с параллельной идентификацией аминокислотных последовательностей пептидов.

Очистка препарата состояла в отделении липидной фракции и обессоливании для получения очищенной пептидной фракции. Для очистки препарата от липидной фракции использовали модифицированный метод Брокерхоффа—Даусона—Хюбшера [23]. Сначала проводили мягкое щелочное дезацелирование фосфолипидов. Методику отработывали на смеси 1 мл протеолипосом из 1—20 мг фосфатидилхолина и 0,05—0,2 мг бацитрацина или грамицидина А. Лиофилизировали 1 мл образца очищенного ЛП Церебролизин, доливали гексан, метанол (1:1, v/v) и разводили в 2 раза раствором 0,25M NaOH в метаноле. Инкубировали 45 мин при встряхивании при комнатной температуре, включая 15 мин при $t=75^{\circ}\text{C}$. Последовательно добавляли метанол, гексан и воду (1:4:4, v/v), перемешивали и центрифугировали 1 мин при 1000 g. Фракцию с гексаном отделяли, водно-метанольную — нейтрализовали HCl до pH 4—6. К нейтральной водно-метанольной фракции добавляли гексан, перемешивали, центрифугировали 1 мин при 1000 g, осторожно отсасывали фракцию с гексаном, не затрагивая осадок на границе раздела фаз. Повторяли процедуру 4 раза. Водно-метанольную фракцию объединяли, лиофилизировали, осадок ресуспендировали сначала в смеси метанол : вода (1:1), супернатант сливали, затем в смеси хлороформ : метанол (1:1), 0,2% ТФУ, супернатанты объединяли, высушивали от хлороформа и обессоливали.

Обессоливание пептидной фракции проводили на мини-колонке при помощи центрифугирования [24]. В мини-колонку 0,75 × 4,5 см («Raining Instrument», США) наливали 2 мл сефадекса G-10 («Pharmacia», Швеция), декантированного в смеси метанол : вода (85:15, v/v), каплями наливали 160 мкл того же раствора и уравнивали на центрифуге 1 мин при 1000 g. Процедуру повторяли до тех пор, пока на выходе не оставалось 150 мкл раствора. Каплями 150 мкл образца наносили на гель и центрифугировали, как описано выше. Гель после однократного использования заменяли. После процедуры обессоливания потеря белка составляли не более 35%.

Протеомный анализ пептидов

Протеомный анализ пептидов осуществляли высокоэффективной жидкостной хроматографией (ВЭЖХ)

с использованием системы Ultimate 3000 RSLCnano («Thermo Scientific», США), соединенной с масс-спектрометром Q-exactive HFX («Thermo Scientific», США). МС-орбитальные «ловушки ионов» в составе таких масс-спектрометров работают в режиме высокого разрешения и позволяют проводить идентификацию молекул пептидов и белков небольшого размера. Быстрая скорость сканирования и распараллеливание процессов хроматографирования и МС пептидов позволяют идентифицировать большое число пептидных фрагментов, что важно при анализе лекарственных препаратов со сложным составом.

Один микрограмм пептидной смеси загружали на обогащающую колонку Acclaim μ -Precolumn (0,5 × 3 mm, размер частиц 5 μm , Thermo Scientific) при потоке 10 мкл/мин в течение 4 мин в изократическом режиме с использованием буфера «С» в качестве подвижной фазы (2% ацетонитрил, 0,1% муравьиная кислота в деионизованной воде). Далее пептиды разделяли на ВЭЖХ-колонке Acclaim Pepmap C18 (75 мкм × 150 мм, размер частиц 2 мкм) («Thermo Scientific», США) в градиентном режиме элюирования. Градиент формировали подвижной фазой А (0,1% муравьиная кислота) и подвижной фазой Б (80% ацетонитрил, 0,1% водный раствор муравьиной кислоты) при скорости потока 0,3 мкл/мин. Колонку промывали 2% подвижной фазой Б в течение 4 мин, после чего линейно увеличивали концентрацию подвижной фазы Б до 35% за 90 мин, затем линейно увеличивали концентрацию фазы Б до 99% за 10 мин, после 10-минутной промывки при 99% буфера Б концентрацию этого буфера линейно снижали до исходных 2% за 6 мин, после этого аналитическую колонку промывали для уравнивания 2% фазой Б в течение 10 мин. Общая длительность анализа составляла 120 мин.

МС-анализ проводили на масс-спектрометре Q-exactive HFX в режиме положительной ионизации с использованием источника NESI («Thermo Scientific», США). Для МС-анализа были установлены следующие параметры настроек: напряжение на эмиттере 2,1 кВ, температура капилляра 240 $^{\circ}\text{C}$. Панорамное сканирование проводили в диапазоне масс от 300 до 1500 m/z при разрешении 120 000. При тандемном сканировании разрешение устанавливали 15 000 в диапазоне масс от 100 m/z до верхней границы, которая определяется автоматически, исходя из массы прекурсора, но не более 2000 m/z. Изоляцию прекурсорных ионов проводили в окне ± 1 Да. Максимальное число разрешенных для изоляции ионов в режиме MS2 было установлено не более 40, при этом граница отсечения для выбора прекурсора для тандемного анализа была установлена как 50 000 единиц, а нормализованная энергия соударения (NCE) равнялась 29. Для тандемного сканирования учитывали только ионы от $z=2+$ до $z=6+$ по зарядному состоянию. Максимальное время накопления для прекурсорных ионов составило 50 мс, для фрагментных ионов — 110 мс. Величину AGC для прекурсоров и фрагментных ионов устанавливали $1 \cdot 10^6$ и $2 \cdot 10^5$ соответственно. Все измеренные прекурсоры динамически исключались из тандемного MS/MS анализа на 90 с.

Последовательности пептидов определяли программным обеспечением Mascot (<http://www.matrixscience.com>) с использованием базы данных аминокислотных последовательностей SwissProt и посредством *de novo*-секвенирования.

De novo-секвенирование пептидов проводили на основании данных диссоциации, вызванной столкновением

(CID). При проведении процедуры CID исследуемые ионы пептидов ускоряются в электростатическом поле и сталкиваются с нейтральными частицами (аргон). При столкновении кинетическая энергия преобразуется во внутреннюю энергию, что приводит к фрагментации пептидного иона на более мелкие фрагменты. Эти фрагменты анализируются посредством тандемной МС [25], в результате чего получается CID-масс-спектр *молекулярных фрагментов пептида*. CID-масс-спектр состоит из «массовой» компоненты (список наблюдаемых масс фрагментов) и «интенсивностной» компоненты (список наблюдаемых интенсивностей фрагментов) [26].

Для получения аминокислотных последовательностей пептидов Церебролизина, для которых были известны только масса, заряд и время хроматографического удержания пептида [20, 21], нами был разработан комплекс программ DNVSEQP для проведения *de novo*-секвенирования пептидов аминокислотных последовательностей по данным CID. Данные программы основаны, во-первых, на применении теории топологического [27], метрического [28, 29], комбинаторного [30] подходов к анализу «больших данных» [31, 32] и, во-вторых, на теории анализа хемографов [33, 34] к задачам хемоинформатики [35], и в частности к задаче идентификации аминокислотных последовательностей по CID-масс-спектрам.

Хемограф — *размеченный конечный граф без петель с кликовым числом не более 3*. Множество вершин χ -графа изоморфно множеству атомов молекулы, множество ребер изоморфно множеству химических связей молекулы, а матрица смежности содержит кратности химических связей. Пусть задано *множество меток* Y (в качестве меток используются химические типы атомов «C», «N», «O» и т.д.), *функция разметки вершин* $\mu: V \rightarrow Y$, и определена *функция оценки метки* $w: Y \rightarrow R$. Разновидностью функции оценки метки является *функция взвешивания* m , вычисляющая атомарную массу для соответствующей метки вершины хемографа.

Пусть $X = X(V, E)$ — хемограф с матрицей смежности $M(X) = \{m_{ij}\}$, соответствующий исследуемому пептиду. Множество $\Gamma = \{(V, E) | V \subset N, E \subset N^2\}$, являющееся множеством всех подграфов бесконечного полного графа $G = (N, N^2)$, будем называть *множеством всех возможных графов*, $\forall X \in \Gamma$, N — натуральный ряд. Произвольный структурный фрагмент молекулы соответствует некоторому *подграфу* соответствующего хемографа X — т.е. графу, содержащему некое подмножество вершин данного графа и подмножество инцидентных этим вершинам ребер. Иначе говоря, множество всех структурных фрагментов молекулы изоморфно *множеству всех замкнутых подграфов* $\Pi(X)$ хемографа $X(V, E)$:

$$\Pi(X) = \left\{ (v, e) \mid v \subseteq V, e \subseteq E, \bigvee (v_1, v_2) : v_1 \in v, v_2 \in v \right\}.$$

Введем *оператор модификации хемографов* $s^{n_x}: \Gamma^{n_x} \rightarrow \Gamma$, где n_x — небольшое натуральное число. В практическом случае n_x редко превышает 2, так как вероятности тримолекулярных и тем более тетрамолекулярных реакций близки к нулю. Определим *множество модификаций хемографов*:

$$S = \{s_1^{n_1}, s_2^{n_2}, \dots, s_{|S|}^{n_{|S|}}\},$$

элементы которого соответствуют *посттрансляционным модификациям белков, добавлению/удалению ОН-групп* и др. Множество возможных МС-фрагментов определяется как

$S \times \Gamma$. Соответственно произвольному фрагменту молекулы X , наблюдаемому в ходе проведения МС-эксперимента с CID-расщеплением молекул, соответствует определенный элемент множества $S \times \Pi(X)$.

Таким образом, хемографу X соответствует множество хемографов $S \times \Pi(X)$, описывающих *возможные фрагменты молекулы* X . Для каждого из этих фрагментов может быть определен инвариант графа — числовая характеристика или упорядоченный список таких характеристик (кортеж), значение которой (которого) одинаково для каждого элемента произвольного класса изоморфных графов. *Элементарным* будем называть инвариант $i: \Gamma \rightarrow R$; *кортеж-инвариантом* — инвариант $i: \Gamma \rightarrow R^n, n \geq 2$. Для каждого элемента $a = (v(a), e(a))$ множества $S \times \Pi(X)$, $v(a) = \{v_1(a), v_2(a), \dots, v_{|v(a)|}(a)\}$, определим аддитивный числовой инвариант хемографа X как:

$$i(a) = \sum_{j=1}^{|v(a)|} w(\mu(v_j(a))),$$

так что множеству $S \times \Pi(X)$ соответствует кортеж-инвариант $i(X) = (i(a) | a \in S \times \Pi(X))$. Молекулярная масса любого элемента $a = (v(a), e(a))$ вычисляется как частный случай элементарного инварианта $i(a)$ при условии, что функция « w » — суть функция взвешивания « m ».

Кортеж-инвариант $i(X)$ соответствует массовой компоненте CID-масс-спектра молекулы X и включает все МС-пики, возможные для X . Экспериментально наблюдаемая массовая компонента CID-масс-спектра молекулы, $i_b(X)$, является подмножеством кортежа $i(X)$, $i_b(X) \subseteq i(X)$. Анализ разрешимости/регулярности задачи оценки изоморфизма по кортеж-инвариантам позволяет отобрать наиболее информативные элементы кортежа инвариантов $i(X)$. Затем, применяя методы машинного обучения на множествах прецедентов ($i(X), i_b(X)$) и получая функцию $f: R^n \rightarrow R^n$, $i_b(X) = f(i(X))$, становится возможным вычисление массового компонента CID-масс-спектра по кортежу $i(X)$. Вычисление значений функции $f(i(X))$ является ключевым компонентом алгоритма *de novo*-секвенирования, используемого в настоящей работе.

После получения результатов *de novo*-секвенирования по всем 10 протеомным экспериментам мы использовали 10-балльную шкалу для полуколичественной оценки содержания пептидов в ЛП Церебролизин. Данная шкала основана на постулате о том, что чем выше концентрация пептида в исследованных образцах, тем в большем числе протеомных экспериментов данный пептид будет найден. При заданном числе протеомных экспериментов (10 в случае настоящего исследования) баллом оценки содержания заданного пептида является число протеомных экспериментов, в которых пептид с заданной аминокислотной последовательностью был найден.

Результаты

Результаты МС-экспериментов наиболее удобно представить в виде двумерных (2D) масс-спектрограмм. Каждая точка 2D-спектрограммы соответствует пептиду; по оси « X » отложено значение молекулярной массы этого пептида, а по оси « Y » — значение хроматографического «времени удержания» пептида (которое характеризует скорость прохождения пептида через хроматографическую колонку).

Объединенная 2D-масс-спектрограмма пептидной фракции ЛП Церебролизин (**рис. 1, на цв. вклейке**), вклю-

чившая результаты всех проведенных протеомных экспериментов (171 039 пептидов в 10 протеомных экспериментах), указывает на ключевые особенности пептидного состава ЛП Церебролизин. В частности, анализ плотности расположения точек на объединенной 2D-масс-спектрограмме пептидной фракции ЛП Церебролизин указывает на преобладание в составе «легкой» пептидной фракции ЛП Церебролизин пептидов с молекулярными массами порядка 400...800 Да (что ориентировочно соответствует средней длине пептида в 5...9 аминокислот).

Кластерный анализ пиков плотности на объединенной 2D-масс-спектрограмме легкой пептидной фракции ЛП Церебролизин подтвердил, что почти 90% всех зарегистрированных пептидов ЛП Церебролизин находятся в диапазоне достаточно низких молекулярных масс (400...600 Да, кластер II; 400...800 Да, кластер I). Пептиды кластера II, характеризующиеся высокими значениями времени удержания (т.е. времени прохождения через хроматографическую колонку менее 5000 с), были преимущественно гидрофобными пептидами без установленной биологической функции.

Мы идентифицировали 14 635 пептидов, соответствующих 1643 белкам протеома свиньи, которые участвуют в функционировании нейронов (рис. 2, на цв. вклейке). Посредством *de novo*-МС-секвенирования мы установили аминокислотные последовательности этих пептидов, причем каждый из этих пептидов встретился при анализе по крайней мере 2 из 10 выборок протеомных данных.

Для оценки биологических ролей установленных пептидов мы провели их сравнение с белками протеома человека. Идентифицированным 14 635 пептидам соответствовали 23 334 аннотации пептидов протеома человека. Аннотации протеома человека были получены на основании анализа данных UNIPROT [36]. Экспертный анализ полученных аннотаций показал, что секвенированные пептиды ЛП Церебролизин могут являться пептидами-миметиками соответствующих пептидов в протеоме человека. Так, 13 997 аннотаций соответствовали пептидам-миметикам, которые могут ингибировать 275 киназ человека, в том числе CDK1, CDK2, TGFBR2, ABL1, GSK3-beta, MTOR. Дополнительно 5657 найденных аннотаций соответствовали 405 пептидным фрагментам из более чем 300 биологически активных пептидов (в том числе нейротрофических нейропептидов). Еще 1967 аннотаций соответствовали пептидам-миметикам, потенциально ингибирующим проапоптотические ферменты-каспазы CASP1, CASP3 и CASP6.

Одним из важнейших результатов настоящего исследования является подтверждение полученных ранее данных [21] о наличии в пептидном составе ЛП Церебролизин фрагментов нейротрофических факторов (табл. 1).

Настоящее исследование позволило идентифицировать в составе ЛП Церебролизин 405 пептидных фрагментов, соответствующих известным биологически активным пептидам, в том числе антибактериальным пептидам (дефенсина, гистатины, и др.), иммуномодуляторным пептидам (гранулин, мансерин и др.), пептидам, регулирующим усвоение жиров (спексин, гастрин, обестатин и др.), вазоактивным пептидам (эндотелин, VIP и др.) (табл. 2).

Обсуждение

Использование современных математических методов *de novo*-секвенирования позволило получить уникальную информацию о пептидном составе ЛП Церебролизин. Для

сравнения в настоящей работе с использованием только стандартного программного обеспечения для белковой МС (пакет MASCOT) нами были установлены последовательности 2221 пептида, что более чем в 3 раза больше, чем число пептидов, установленных ранее [22]. С использованием разработанных нами процедур *de novo*-МС-секвенирования были получены последовательности 14 635 пептидов ЛП Церебролизин.

Анализ пептидного состава препарата, проведенные ранее с использованием стандартных процедур секвенирования белков, указали на наличие в составе ЛП Церебролизин пептидных фрагментов энкефалинов (YGGFL, GGFLR, YGGFM), ФРН (GEFSV, NSYCTTT), орексина (CCRQK), галанина (WWLNSAGY) и др. [21]. В настоящем исследовании подтверждено наличие этих пептидных фрагментов, установлено присутствие других пептидных фрагментов перечисленных нейротрофических факторов и получены полуколичественные оценки содержания этих пептидов в ЛП Церебролизин.

Механизмы действия нейротрофических факторов, приведенных в табл. 1, были подробно рассмотрены ранее [20, 21]. ФРН активирует рецепторы TrkA, LNGFR и необходим для восстановления сетей нейронов с повреждениями, возникающими вследствие ИИИ или ЧМТ. Известны модельные пептиды, включающие пептид GEFSV (119—123), проявляющие ФРН-подобную активность [37]. Найденные в настоящем исследовании пептидные фрагменты ФРН, образующиеся при неспецифическом протеолизе протеома свиньи в процессе производства ЛП Церебролизин, относились:

1) к фрагментированному пропептиду ФРН (аминокислоты 19—121, используя нумерацию последовательности Q29074 в базе данных UNIPROT), в том числе пептиды VLFSTQ 75—80, PPVAAD 82—87, PDLEAS 91—96, DLEASG 92—97 и др. (рис. 3, на цв. вклейке);

2) к сигнальному пептиду ФРН (NVPAGH 13—18 и др.);

3) к зрелой молекуле ФРН (пептиды GEFSV 119—123, NSYCTTT 187—192).

Как было показано ранее [21], пептиды ЛП Церебролизин GEFSV и NSYCTTT могут взаимодействовать с рецептором TrkA, участвующим в осуществлении нейротрофических эффектов ФРН.

Энкефалины YGGFL и YGGFM — эндогенные опиоидные пептидные нейротрансмиттеры, поддерживающие множество нейрофизиологических функций, в том числе регенерацию нейронов. Орексин увеличивает уровни экспрессии нейротрофина-3 [38], поддерживая выживание и дифференциацию нейронов. Пептид CCRQK может иметь важное значение для взаимодействия орексина-А с рецепторами [20]. Галанин модулирует секрецию ацетилхолина, серотонина и норадреналина [39], необходим для «спраутинга» аксонов [40].

Помимо подтверждения результатов предыдущих исследований состава ЛП Церебролизин, настоящий анализ указал на наличие в его составе пептидов-миметиков, которые могут ингибировать 275 киназ человека (в том числе CDK1, CDK2, TGFBR2, ABL1, GSK3-beta, MTOR). Ингибирование киназ GSK3-beta и MTOR соответствует нейротрофическому и нейропротективному действию ЛП Церебролизин, а ингибирование киназ CDK1, CDK2, TGFBR2, ABL1 — противоопухолевому действию препарата [8].

Заметим, что в табл. 1 приведены полуколичественные оценки числа пептидов. Определение точного количества

Таблица 1. Данные о пептидном составе ЛП Церебролизин методом масс-спектрометрического *de novo*-секвенированияTable 1. Confirmation of the previously obtained data on the peptide composition of Cerebrolysin by the results of the mass spectrometric *de novo* sequencing

Ранее выявленные пептиды [21]	Последовательность белка по базе данных NCBI/UNIPROT	Настоящая работа	Оценка количества пептидов по 10-балльной шкале
GEFSV, NSYCTTT	Q29074 Фактор роста нервов (NGF)	54 пептида, в том числе:	
		DLEASG	10
		PDLEAS	7
		VLFTSQ	5
		PPVAAD	5
		NVPAGH	5
		GEFSV	5
YGGFL, GGFLR	P01214 Бета-неоэндофин-динорфин	13 пептидов, в том числе:	
		YGGFLRR	10
		YGGFL	8
		GGFLR	8
		YGGFLR	6
		GEGDGD	6
		GGFLRR	5
YGGFM	P01192 Энкефалины, опиомеланокортин	85 пептидов, в том числе:	
		DAQQND	3
		DLSAET	10
		LLLTL	10
		YGLVAE	10
		PLVTLF	9
		YGGFM	8
PQRF	ACQ82801 Нейропептид VF	45 пептидов, в том числе:	
		QPLTEN	6
		LVAEAE	5
		LTENPR	5
		DLSTES	5
		LPLRFG	10
		LNFEEL	10
		FANLPL	10
		SFANLP	8
		VPNLPQ	4
PLRFGR	4		
CCRQK	O77668 Орехсин	17 пептидов, в том числе:	
		NLHSK	4
		NFEELKD	4
		MEVSLV	4
		EVSLVR	4
WWLNSAGY	P07480 Галанин	21 пептид, в том числе:	
		PQRF	3
		LYELLH	7
		YELLHG	3
		QASGNH	3
CCRQK	3		
LNSAGY	P07480 Галанин	LNSAGY	10
		GLGSPV	5
		YLLGPH	4
		LQSEDK	4
		LGLGSPV	3
		FLAFLH	3
		LGSPVK	2

Таблица 2. Примеры других нейропептидных фрагментов (пептиды упорядочены по убыванию оценки количества)

Table 2. Examples of other neuropeptide fragments found in this work. The peptides are sorted in descending order in relation to the amount estimate

Пептид	SWISS-PROT	Нейропептид	Оценка количества
LELELG	Q5JTD0	Нейрокинин-В	6
EWLSPR	O15130	Нейропептид АF	5
KELLQL	P01210	Синэнкефалин	5
LAAVLG	P18509	Активирующий аденилатциклазу полипептид гипофиза 27 (PACAP)	5
YGGFMR	P01210	Met-энкефалин-Arg-Gly-Leu	5
DLPEPR	P08949	Нейромедин-В-32	4
FHLLRE	P06850	Кортиколиберин	4
LLGGSE	O15240	Нейроэндокринный регуляторный пептид-1	4
LLLMDL	Q8WNQ7	Галаниноподобный пептид	4
LLQLSK	P01210	Синэнкефалин	4
PYLALK	P20382	Нейропептид глицин-глутаминовая кислота	4
QVALLK	P20366	Нейропептид К	4
ELELGQ	Q5JTD0	Нейрокинин-В	3
LDLTFH	P06850	Кортиколиберин	3
LDKFKDK	Q5JTD0	Нейрокинин-В	3
SVAFPA	P20382	Нейропептид глицин-глутаминовая кислота	3
VAFPAE	P20382	Нейропептид глицин-глутаминовая кислота	3
VDFTKK	Q5H8A3	Нейромедин-S	3
AALLTG	Q8WNQ7	Галаниноподобный пептид	2

отдельных пептидов по МС-данным является сложной исследовательской задачей. Решение этой задачи становится еще более сложным в случае исследования пептидных препаратов природного происхождения (в которых количество индивидуальных пептидов может существенно варьировать). Поэтому в настоящей работе мы использовали 10-балльную шкалу для полуколичественной оценки содержания пептидов в ЛП Церебролизин.

Также следует отметить, что результаты, полученные в настоящей работе, косвенно указывают на возможную контрафактность образцов, исследованных в работе В. Gevaert и соавт. [22]. Например, в образцах ЛП Церебролизин, исследуемых нами ранее [20, 21], более 5 лет назад, равно как и в настоящей работе, были найдены многочисленные пептидные фрагменты различных нейротрофических факторов. И наоборот, среди приводимых в работе В. Gevaert и соавт. [22] пептидов нами были подтверждены только три пептидных фрагмента актина: TEAPLNPK, DFEQEM (в составе более длинного фрагмента LCYVALDFEQEMATAASSSSLEK) и VAPEENP (в составе VAPEENPVLLTEAPLNPK), в то время как остальные 600 пептидов, приводимые В. Gevaert и соавт. [22], не были идентифицированы. Наш опыт анализа пептидного состава препаратов показывает, что такая низкая степень соответствия состава и очевидное преобладание пептидных фрагментов актина характерны именно для низкостандартизированных экстрактов тканей головного мозга (каковым ЛП Церебролизин не является [7]).

Результаты настоящего исследования также указали на присутствие в исследованных образцах ЛП Церебролизин 405 пептидных фрагментов, соответствующих антибактериальным пептидам дефенсинам и гистатинам, иммуномодуляторным пептидам гранулина и мансерина, пептидам спексина, гастринина, обестатина, регулирующим усвоение жиров, и вазоактивным пептидам эндотелина и VIP.

Синэнкефалин (пептиды KELLQL, LLQLSK) является синергистом энкефалинов, *пептид PACAP* — вазоактивный нейротрансмиттер и нейромодулятор. *Нейроэндокринный регуляторный пептид-1* подавляет соль-индуцированную или ангиотезин-2-индуцированную секрецию вазопрессина в гипоталамусе и гипофизе [41]. *Галаниноподобный пептид* поддерживает эффекты галанина, а *нейропептид глицин-глутаминовая кислота* — энергетический метаболизм нейронов. *Нейропептид К* проявляет гипотензивное и ноотропное действие, также регулируя энергетический метаболизм ЦНС [42]. Нейропептид *нейромедин-В32* регулирует рост нейронов, уровни глюкозы, артериальное давление и посредством фактора CREB проявляет ноотропные эффекты [43]. *Нейромедин-S* поддерживает циркадианный ритм, регулирует синтез других пептидных гормонов и проявляет нейротрофическое действие [44].

Перспективным направлением дальнейших исследований пептидного состава ЛП Церебролизин представляется выявление пептидов, которые встречаются в образцах ЛП Церебролизин наиболее часто, модулируют активность кинема человека, тем самым усиливая нейротрофические эффекты препарата и противоопухолевую защиту, характеризуются мультитаргетным воздействием (ингибирование одним пептидом одновременно нескольких киназ и т.п., что является одной из основ плеiotропного эффекта ЛП Церебролизин) и также оказывают противовоспалительное действие.

Заключение

Несмотря на существование доказательной базы и результаты многочисленных экспериментальных исследований, точные механизмы фармакологического действия ЛП Церебролизин заслуживают детального изучения, так как остаются «за кадром» для большинства неврологов. *De novo-*

секвенирование пептидной фракции ЛП Церебролизин, проведенное в настоящей работе на основе данных гибридной МС, позволило установить аминокислотные последовательности 14 635 пептидов, ассоциированных с функционированием нейронов. Одним из важнейших результатов является подтверждение наличия в составе ЛП Церебролизин активных нейропептидных фрагментов Leu- и Met-энкефалинов, орексина, нейропептида VF, галанина и ФРН. Кроме того, впервые в составе ЛП Церебролизин идентифицировано 8953 пептида, которые могут являться модуляторами киназа человека (в том числе киназ CDK1, CDK2, TGFBR2, GSK3, MTOR) и ингибиторами проапоптогиче-

ских и провоспалительных каспаз CASP1, CASP3 и CASP6. Данные результаты вносят существенный вклад в понимание широкого спектра фармакологического действия ЛП Церебролизин (прежде всего нейротрофического, нейропротективного и противовоспалительного эффектов).

Работа выполнена по гранту 18-07-00944 РФФИ.

Хромато-масс-спектрометрические измерения выполнены с использованием оборудования ЦКП «Протеом человека» (ИБМХ), математические расчеты и анализ полученных пептидов — с использованием международных баз данных и оборудования ФИЦ ИУ РАН.

**Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.
The authors declare no conflicts of interest.**

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Селезнева Н.Д., Рощина И.Ф., Коровайцева Г.И., Гаврилова С.И. Профилактика прогрессирования когнитивной недостаточности у родственников 1-й степени родства пациентов с болезнью Альцгеймера. *Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова*. 2018;118(10):30-36.
2. Selezneva ND, Roshchina IF, Korovaitseva GI, Gavrilova SI. Prevention of progression of cognitive decline in the first-degree relatives of patients with Alzheimer's disease. *Zhurnal Nevrologii i Psihiatrii im. S.S. Korsakova*. 2018;118(10):30-36. (In Russ.).
<https://doi.org/10.17116/jnevro201811810130>
3. Dong HY, Jiang XM, Niu CB, Du L, Feng JY, Jia FY. Cerebrolysin improves sciatic nerve dysfunction in a mouse model of diabetic peripheral neuropathy. *Neural Regen Res*. 2016;11(1):156-162.
<https://doi.org/10.4103/1673-5374.175063>
4. Zhang L, Chopp M, Lu M, Zhang T, Li C, Winter S, Brandstaetter H, Doppler E, Meier D, Pabla P, Zhang ZG. Demonstration of therapeutic window of Cerebrolysin in embolic stroke: A prospective, randomized, blinded, and placebo-controlled study. *Int J Stroke*. 2017;12(6):628-635.
<https://doi.org/10.1177/1747493017702665>
5. Alzoubi KH, Al-Ibbini AM, Nuseir KQ. Prevention of memory impairment induced by post-traumatic stress disorder by cerebrolysin. *Psychiatry Res*. 2018;270:430-437.
<https://doi.org/10.1016/j.psychres.2018.10.008>
6. Ghavimi H, Darvishi S, Ghanbarzadeh S. Attenuation of Morphine-Induced Tolerance and Dependence by Pretreatment with Cerebrolysin in Male rats. *Drug Res (Stuttg)*. 2018;68(1):33-37.
<https://doi.org/10.1055/s-0043-116948>
7. Mahmoudi J, Mohaddes G, Erfani M, Sadigh-Eteghad S, Karimi P, Rajabi M, Reyhani-Rad S, Farajdokht F. Cerebrolysin attenuates hyperalgesia, photophobia, and neuroinflammation in a nitroglycerin-induced migraine model in rats. *Brain Res Bull*. 2018;140:197-204.
<https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2018.05.008>
8. Громова О.А., Калачева А.Г., Гришина Т.Р., Богачева Т.Е., Демидов В.И., Торшин И.Ю. Нейротрофические пептиды церебролизина как основа противосудорожного потенциала препарата. *Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова*. 2016;116(3):55-62.
9. Gromova OA, Kalacheva AG, Grishina TR, Bogacheva TE, Demidov VI, Torshin IYu. Neurotrophic peptides of small es, Cyrillicerobrolysin as a basis for anticonvulsant effect of the drug. *Zhurnal Nevrologii i Psihiatrii im. S.S. Korsakova*. 2016;116(3):55-62. (In Russ.).
<https://doi.org/10.17116/jnevro20161163155-62>
10. Громова О.А., Пронин А.В., Торшин И.Ю., Калачева А.Г., Филимонова М.В., Демидов В.И., Гоголева И.В., Гришина Т.Р. Оценка противопухолевого потенциала церебролизина. *Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова*. 2016;116(11):69-77.
11. Gromova OA, Pronin AV, Torshin IYu, Kalacheva AG, Filimonova MV, Demidov VI, Gogoleva IV, Grishina TR. Evaluation of the antitumor potential of cerebrolysin. *Zhurnal Nevrologii i Psihiatrii im. S.S. Korsakova*. 2016;116(11):69-77. (In Russ.).
<https://doi.org/10.17116/jnevro20161161169-77>
12. Stan A, Birle C, Blesneag A, Iancu M. Cerebrolysin and early neurorehabilitation in patients with acute ischemic stroke: a prospective, randomized, placebo-controlled clinical study. *J Med Life*. 2017;10(4):216-222.
13. Park YK, Yi HJ, Choi KS, Lee YJ, Kim DW, Kwon SM. Cerebrolysin for the Treatment of Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage in Adults: A Retrospective Chart Review. *Adv Ther*. 2018;35(12):2224-2235.
<https://doi.org/10.1007/s12325-018-0832-8>
14. Малашенкова И.К., Крынский С.А., Хайлов Н.А., Огурцов Д.П., Селезнева Н.Д., Федорова Я.Б., Пономарева Е.В., Колыхалов И.В., Гаврилова С.И., Дидковский Н.А. Противовоспалительные эффекты нейротрофической терапии (применение церебролизина при мягком когнитивном снижении). *Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова*. 2018;118(5):39-44.
15. Malashenkova IK, Krynskiy SA, Hailov NA, Ogurtsov DP, Selezneva ND, Fedorova YaB, Ponomareva EV, Kolyhalov IV, Gavrilova SI, Didkovsky NA. Anti-inflammatory effects of neurotrophic therapy (a pilot study). *Zhurnal Nevrologii i Psihiatrii im. S.S. Korsakova*. 2018;118(5):39-44. (In Russ.).
<https://doi.org/10.17116/jnevro20181185139>
16. Чутко Л.С., Яковенко Е.А., Сурушкина С.Ю., Крюкова Е.М., Палаева С.В. Эффективность церебролизина при расстройствах аутистического спектра. *Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова*. 2017;117(9):71-75.
17. Chutko LS, Yakovenko EA, Surushkina SYu, Kryukova EM, Palaieva SV. The efficacy of cerebrolysin in the treatment of autism spectrum disorders. *Zhurnal Nevrologii i Psihiatrii im. S.S. Korsakova*. 2017;117(9):71-75. (In Russ.).
<https://doi.org/10.17116/jnevro20171179171-75>
18. Серкина Е.В., Громова О.А., Торшин И.Ю., Сотникова Н.Ю., Никоннов А.А. Церебролизин облегчает состояние больных с перинатальным поражением ЦНС через модуляцию аутоиммунитета и антиоксидантную защиту. *Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова*. 2008;108(11):62-66.
19. Serkina EV, Gromova OA, Torshin IYu, Sotnikova NYu, Nikonov AA. Cerebrolysin alleviates perinatal CNS disorders through the autoimmune modulation and antioxidant protection. *Zhurnal Nevrologii i Psihiatrii im. S.S. Korsakova*. 2008;108(11):62-66. (In Russ.).
20. Bornstein NM, Guekht A, Vester J, Heiss WD, Gusev E, Homberg V, Rahlfs VW, Bajenaru O, Popescu BO, Muresanu D. Safety and efficacy of Cerebrolysin in early post-stroke recovery: a meta-analysis of nine randomized clinical trials. *Neurol Sci*. 2018;39(4):629-640.
<https://doi.org/10.1007/s10072-017-3214-0>
21. Gauthier S, Proano JV, Jia J, Froelich L, Vester JC, Doppler E. Cerebrolysin in mild-to-moderate Alzheimer's disease: a meta-analysis of randomized controlled clinical trials. *Dement Geriatr Cogn Disord*. 2015;39(5-6):332-347.
<https://doi.org/10.1159/000377672>
22. Ghaffarparand F, Torabi S, Rasti A, Niakan MH, Aghabaklou S, Pakzad F, Beheshtian MS, Tabrizi R. Effects of cerebrolysin on functional outcome of patients with traumatic brain injury: a systematic review and meta-analysis. *Neuropsychiatr Dis Treat*. 2018;15:127-135.
<https://doi.org/10.2147/NDT.S186865>
23. Zhang L, Chopp M, Wang C, Zhang Y, Lu M, Zhang T, Zhang ZG. Prospective, double blinded, comparative assessment of the pharmacological activity of Cerebrolysin and distinct peptide preparations for the treatment of embolic stroke. *J Neurol Sci*. 2019;398:22-26.
<https://doi.org/10.1016/j.jns.2019.01.017>
24. Stepanichev M, Onufriev M, Aniol V, Freiman S, Brandstaetter H, Winter S, Lazareva N, Guekht A, Gulyaeva N. Effects of cerebrolysin on nerve growth

- factor system in the aging rat brain. *Restor Neurol Neurosci.* 2017;35(6):571-581.
https://doi.org/10.3233/RNN-170724. PMID:29172008
19. Громова О.А., Торшин И.Ю., Гоголева И.В., Пронин А.В., Стельмашук Е.В., Исаев Н.К., Генрихс Е.Е., Демидов В.И., Волков А.Ю., Хаспеков Г.Л., Александрова О.П. Фармакокинетический и фармакодинамический синергизм между нейропептидами и литием в реализации нейротрофического и нейропротективного действия церебролизина. *Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова.* 2015;115(3):65-72.
Gromova OA, Torshin IYu, Gogoleva IV, Pronin AV, Stelmashuk EV, Isaev NK, Genrikhs EE, Demidov VI, Volkov AYU, Khaspekov GL, Alexandrova OP. Pharmacokinetic and pharmacodynamic synergism between neuropeptides and lithium in the neurotrophic and neuroprotective action of cerebrolysin. *Zhurnal Nevrologii i Psihiatrii im. S.S. Korsakova.* 2015;115(3):65-72. (In Russ.).
https://doi.org/10.17116/jnevro20151153165-72
 20. Громова О.А., Третьяков В.Е., Мошковский С.А., Гусев Е.И., Никонов А.А., Валькова Л.А., Глибин А.С., Катаев А.С. Олигопептидная мембранная фракция церебролизина. *Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова.* 2006;106(7):68-70.
Gromova OA, Treťiakov VE, Moshkovskii SA, Gusev EI, Nikonov AA, Val'kova LA, Glibin AS, Kataev AS. An oligopeptide membrane fraction of cerebrolysin. *Zhurnal Nevrologii i Psihiatrii im. S.S. Korsakova.* 2006;106(7):68-70. (In Russ.).
 21. Громова О.А., Торшин И.Ю., Гоголева И.В. Механизмы нейротрофического и нейропротекторного действия препарата церебролизин при ишемии головного мозга. *Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова (Спецвыпуск).* 2014;114(3):43-50.
Gromova OA, Torshin IYu, Gogoleva IV. Mechanisms of neurotrophic and neuroprotective effects of cerebrolysin in cerebral ischemia. *Zhurnal Nevrologii i Psihiatrii im. S.S. Korsakova.* 2014;114(3 Pt 2):43-50. (In Russ.).
 22. Gevaert B, D'Hondt M, Bracke N, Yao H, Wynendaele E, Vissers JP, De Secco M, Claereboudt J, De Spiegeleer B. Peptide profiling of Internet-obtained Cerebrolysin using high performance liquid chromatography — electrospray ionization ion trap and ultra high performance liquid chromatography — ion mobility — quadrupole time of flight mass spectrometry. *Drug Test Anal.* 2015;7(9):835-842.
https://doi.org/10.1002/dta.1817
 23. Кейтс М. *Техника липидологии.* М.: Мир; 1975.
Keits M. *Tekhnika lipidologii.* М.: Mir; 1975. (In Russ.).
 24. Дарбре А. *Практическая химия белка.* М.: Мир; 1989.
Darbre A. *Prakticheskaya khimiya belka.* М.: Mir; 1989. (In Russ.).
 25. Wells JM, McLuckey SA. Collision-induced dissociation (CID) of peptides and proteins. *Meth Enzymol Methods in Enzymology.* 2005;402:148-185.
https://doi.org/10.1016/S0076-6879(05)02005-7
 26. Frank AM. Predicting intensity ranks of peptide fragment ions. *J Proteome Res.* 2009;8(5):2226-2240.
https://doi.org/10.1021/pr800677f
 27. Torshin IYu, Rudakov KV. On the theoretical basis of metric analysis of poorly formalized problems of recognition and classification. *Pattern Recognition and Image Analysis (Advances in Mathematical Theory and Applications).* 2015;25(4):577-587.
 28. Torshin IYu, Rudakov KV. On metric spaces arising during formalization of problems of recognition and classification. part 1: properties of compactness. *Pattern Recognition and Image Analysis (Advances in Mathematical Theory and Applications).* 2016;26(2):274-284.
 29. Torshin IYu, Rudakov KV. On metric spaces arising during formalization of problems of recognition and classification. part 2: density properties. *Pattern Recognition and Image Analysis (Advances in Mathematical Theory and Applications).* 2016;26(3):483-496.
 30. Torshin IYu. The study of the solvability of the genome annotation problem on sets of elementary motifs. *Pattern Recognition and Image Analysis (Advances in Mathematical Theory and Applications).* 2011;21:4:652-662.
 31. Torshin IYu, Rudakov KV. Combinatorial analysis of the solvability properties of the problems of recognition and completeness of algorithmic models. part 1: factorization approach. *Pattern Recognition and Image Analysis (Advances in Mathematical Theory and Applications).* 2017;27(1):16-28.
part 2: metric approach within the framework of the theory of classification of feature values. *Pattern Recognition and Image Analysis (Advances in Mathematical Theory and Applications).* 2017;27(2):184-199.
 32. Torshin IYu, Rudakov KV. Combinatorial analysis of the solvability properties of the problems of recognition and completeness of algorithmic models. part 2: metric approach within the framework of the theory of classification of feature values. *Pattern Recognition and Image Analysis (Advances in Mathematical Theory and Applications).* 2017;27(2):184-199.
 33. Torshin IYu, Rudakov KV. On the application of the combinatorial theory of solvability to the analysis of chemographs. part 1: fundamentals of modern chemical bonding theory and the concept of the chemograph. *Pattern Recognition and Image Analysis (Advances in Mathematical Theory and Applications).* 2014;24:1:11-23.
 34. Torshin IYu, Rudakov KV. On the application of the combinatorial theory of solvability to the analysis of chemographs: part 2. local completeness of invariants of chemographs in view of the combinatorial theory of solvability. *Pattern Recognition and Image Analysis (Advances in Mathematical Theory and Applications).* 2014;24:2:196-208.
 35. Торшин И.Ю., Громова О.А., Сардарян И.С., Федотова Л.Э. Сравнительный хемореактивный анализ мексидола. *Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова.* 2017;117(1. Vyp. 2):75-83.
Torshin IYu, Gromova OA, Sardaryan IS, Fedotova LE. A comparative chemoreactome analysis of mexidol. *Zhurnal Nevrologii i Psihiatrii im. S.S. Korsakova.* 2017;117(1. Vyp. 2):75-83. (In Russ.).
https://doi.org/10.17116/jnevro20171171275-84.
 36. UniProt Consortium. UniProt: a worldwide hub of protein knowledge. *Nucleic Acids Res.* 2019;8:47(D1):506-515. PMID:30395287.
https://doi.org/10.1093/nar/gky1049
 37. Colangelo AM, Bianco MR, Vitagliano L, Cavaliere C, Cirillo G, De Gioia L, Diana D, Colombo D, Redaelli C, Zaccaro L, Morelli G, Papa M, Sarmientos P, Alberghina L, Martegani E. A new nerve growth factor-mimetic peptide active on neuropathic pain in rats. *J Neurosci.* 2008;28(11):2698-2709.
https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5201-07.2008
 38. Yamada N, Katsuura G, Tatsuno I, Kawahara S, Ebihara K, Saito Y, Nakao K. Orexins increase mRNA expressions of neurotrophin-3 in rat primary cortical neuron cultures. *Neurosci Lett.* 2009;450(2):132-135.
https://doi.org/10.1016/j.neulet.2008.11.028
 39. Vrontakis ME. Galanin: a biologically active peptide. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord.* 2002;1(6):531-541.
 40. Suarez V, Guntinas-Lichius O, Streppel M, Ingorokva S, Grosheva M, Neiss WF, Angelov DN, Klimaschewski L. The axotomy-induced neuropeptides galanin and pituitary adenylate cyclase-activating peptide promote axonal sprouting of primary afferent and cranial motor neurones. *Eur J Neurosci.* 2006;24(6):1555-1564.
https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2006.05029.x
 41. Toshina K, Nakazato M. Neuroendocrine regulatory peptide-1 and -2: novel bioactive peptides processed from VGF. *Cell Mol Life Sci.* 2009;66(11-12):1939-1945.
https://doi.org/10.1007/s00018-009-8796-0
 42. Vadnal J. NeuroPeptide K. In book: *Reference Module in Biomedical Sciences, xPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference.* 2007;1-5.
https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.99363-2
 43. Jensen RT, Battey JF, Spindel ER, Benya RV. International Union of Pharmacology. LXVIII. Mammalian bombesin receptors: nomenclature, distribution, pharmacology, signaling, and functions in normal and disease states. *Pharmacol Rev.* 2008;60(1):1-42.
https://doi.org/10.1124/pr.107.07108
 44. Sakamoto T, Mori K, Miyazato M, Kangawa K, Sameshima H, Nakahara K, Murakami N. Involvement of neuromedin S in the oxytocin release response to suckling stimulus. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008;375(1):49-53.
https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2008.07.124

Поступила 06.06.19

Received 06.06.19

Принята к печати 10.07.19

Accepted 10.07.19