

*На правах рукописи*

**Пелогейкина Юлия Александровна**

**РЕГУЛЯЦИЯ МЕТАБОЛИЗМА ИШЕМИЗИРОВАННОГО СЕРДЦА  
СТРУКТУРНЫМИ АНАЛОГАМИ ПЕПТИДА АПЕЛИНА-12**

03.01.04 – биохимия

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Москва – 2015

Работа выполнена в лаборатории метаболизма сердца Научно-исследовательского института экспериментальной кардиологии ФГБУ «Российский кардиологический научно-производственный комплекс» Министерства здравоохранения РФ.

**Научный руководитель:**

Доктор биологических наук,  
руководитель лаборатории метаболизма  
сердца НИИЭК ФГБУ «РКНПК» Минздрава  
РФ

**Писаренко Олег Иванович**

**Официальные оппоненты:**

Доктор биологических наук, профессор,  
заведующий лабораторией синтеза биологически  
активных соединений ФГБНУ «Научно-  
исследовательский институт биомедицинской химии  
имени В.Н. Ореховича»

**Мишарин Александр Юрьевич**

Доктор биологических наук, профессор,  
заведующий лабораторией структуры и функции  
митохондрий Научно-исследовательский институт  
физико-химической биологии имени  
А.Н.Белозерского МГУ имени М.В. Ломоносова

**Зоров Дмитрий Борисович**

**Ведущая организация:**

Федеральное государственное учреждение «Федеральный исследовательский центр  
«Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук»

Защита состоится 24 марта 2015 года в 13:30 на заседании диссертационного совета Д208.073.01 по присуждению ученой степени кандидата биологических наук в ФГБУ «Российский кардиологический научно-производственный комплекс» Министерства здравоохранения РФ по адресу: 121552, г. Москва, ул. 3-я Черепковская, д.15А.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте ФГБУ «РКНПК» Министерства здравоохранения РФ.

Автореферат разослан « \_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2015 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,  
кандидат медицинских наук

**И.В. Сергиенко**

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность темы исследования

Распространение заболеваний сердечно-сосудистой системы требует разработки и эффективного лечения ишемической болезни сердца (ИБС) и таких ее тяжелых форм как инфаркт миокарда (ИМ) и сердечная недостаточность (СН). Традиционно используемыми средствами при лечении ИБС являются нитросоединения пролонгированного действия,  $\beta$ -адреноблокаторы, ингибиторы ангиотензин превращающего фермента (АПФ), антагонисты  $Ca^{2+}$  и миокардиальные цитопротекторы (Свистов А.С. и др, 2010). Наряду с этим проводится направленный поиск новых соединений, способных воздействовать на адаптационные механизмы в миокардиальных клетках в условиях изменившегося кислородного и энергетического обеспечения и, таким образом, уменьшать повреждение сердца. При ишемии и последующей реперфузии в миокарде усиливается образование ряда присущих организму факторов – адипокинов, цитокинов и вазоактивных пептидов, инициирующих механизмы запрограммированного клеточного выживания, которые запускаются каскадами реперфузионных киназ. К таким соединениям относится адипокин апелин, являющийся лигандом сопряженного с  $G_i$ -белком APJ рецептора. Ген апелина активно экспрессируется различными тканями, включая эндотелиальные и гладкомышечные клетки коронарных сосудов и кардиомиоциты. Активация системы апелин/APJ оказывает мощное регуляторное действие на сердечно-сосудистую систему, препятствуя образованию атеросклеротических бляшек, оказывая вазодилатирующее действие на сосуды, стимулируя транспорт ионов  $Ca^{2+}$  в кардиомиоциты и улучшая сократимость миокарда (Pitkin S. et al., 2010).

Наиболее биологически активными являются С-концевые фрагменты апелина, содержащие 13 и 12 аминокислотных остатков. По мнению ряда авторов, защитное действие апелина опосредовано активацией компонентов сигнального каскада реперфузионных киназ, включающих фосфатидилинозитол-3 киназу (PI3K) и Akt (протеинкиназу B), митоген-активируемую протеинкиназу p44/42 и регулируемую внеклеточными сигналами киназу ERK1/2, что приводит к закрытию митохондриальной поры (Rastaldo R. et al., 2011). При запуске апелином каскадов, включающих PI3-Akt киназы и MAP киназы, происходит активация эндотелиальной NO-синтазы. Предполагается, что апелин усиливает ее фосфорилирование, тем самым увеличивает продукцию NO и снижает артериальное давление (Tatemoto K., 2001). В связи с этим система апелин – APJ рецептор представляется перспективной терапевтической мишенью для фармакологического воздействия у пациентов с ИБС, СН и артериальной гипертензией.

Существенно, что у пациентов с острым ИМ уровень апелина в крови значительно ниже, чем у здоровых лиц и сохраняется сниженным в течение нескольких месяцев (Weir R.A. et al., 2009). Этот факт предполагает возможность использования экзогенного апелина при ИМ. Однако, короткий (несколько минут) период полувыведения природных пептидов апелина из кровотока, обусловленный наличием активных амино- и карбоксипептидаз, затрудняет их применение в клинике (Jarr A.G. et al., 2008). В целом ряде лабораторий предпринимаются попытки стабилизации апелина и создания фармакологических лигандов APJ рецептора (Wang W. et al., 2013; Jia Z.Q. et al., 2012). Для пролонгирования устойчивости природного апелина-12 (A12) и повышения его стабильности при хранении в лаборатории синтеза пептидов ФГБУ «РКНПК» МЗ РФ были синтезированы структурные аналоги этого пептида (Патент РФ №2457216 от 27.07.2012). Эти соединения являются оригинальными, их биологическая активность ранее не исследовалась.

**Цель работы** состояла в изучении кардиопротекторного действия химически модифицированных аналогов природного апелина A12 при моделировании ишемического и реперфузионного повреждения сердца.

### **Задачи**

1. Выяснить влияние структурных аналогов A12 на метаболизм ишемизированного сердца и повреждения клеточных мембран на моделях *ex vivo* и *in vivo*.
2. Изучить влияние внутривенного введения структурных аналогов A12 на изменения показателей гемодинамики и ограничения размеров ИМ у крыс *in vivo*.
3. Выяснить роль NO-синтазы в механизмах защитного действия этих пептидов.
4. Оценить влияние исследуемых пептидов на антиоксидантное состояние реперфузированного сердца и образование активных форм кислорода и продуктов перекисного окисления липидов.
5. Исследовать эффективность кардиозащиты структурными аналогами A12 с целью выбора оптимальной пептидной молекулы для создания противоишемического лекарственного средства.

### **Научная новизна**

Впервые получены экспериментальные подтверждения того, что синтетические аналоги природного пептида A12 способны защищать сердце в условиях экспериментальной ишемии и реперфузии. Показано, что введение этих пептидов улучшает восстановление

функции изолированного сердца крысы при реперфузии и ограничивает размеры ИМ при внутривенном введении у крыс *in vivo*. Выяснено, что эти эффекты сопровождаются лучшим сохранением энергетического обмена и стабильности мембран постишемических кардиомиоцитов. Обнаружено, что снижение образования активных форм кислорода (АФК) и уменьшение перекисного окисления липидов (ПОЛ) при реперфузии под действием структурных аналогов А12 обусловлено увеличением активности ключевых ферментов антиоксидантной защиты сердца – медь/цинковой супероксиддисмутазы (Cu/Zn СОД), каталазы (КАТ) и глутатионпероксидазы (ГП).

### **Теоретическая и практическая значимость работы.**

Выяснено, что механизмы действия новых синтетических аналогов А12 при экспериментальной ишемии и реперфузии сердца связаны с образованием NO и антиоксидантными свойствами пептидов. Доказана перспективность использования модифицированных С-концевых фрагментов апелина для создания лекарственных препаратов, обладающих антиишемическим действием. На основании полученных результатов выбрана оптимальная молекула пептида, обеспечивающая наиболее эффективную защиту сердца и минимальные нарушения показателей гемодинамики.

### **Положения, выносимые на защиту**

1. Структурные аналоги А12 улучшают восстановление сократительной и насосной функции сердца и уменьшают размеры ИМ при экспериментальной ишемии и реперфузии.
2. Модифицированные пептиды улучшают энергетическое состояние реперфузированного сердца и снижают повреждения мембран кардиомиоцитов.
3. Введение ингибитора NO-синтаз L-NAME ослабляет кардиозащитное действие пептидов.
4. Структурные аналоги А12 улучшают антиоксидантное состояние реперфузированного сердца, снижают образование АФК и ПОЛ.
5. Наиболее эффективные аналоги А12 целесообразно использовать для создания противоишемических лекарственных средств.

### **Апробация работы**

Основные результаты диссертационной работы были представлены и обсуждены на 5 всероссийских и международных конференциях: VII Международной Крымской конференции «Окислительный стресс и свободнорадикальные патологии» (Судак, Украина, 22–30 сентября 2011 года), Heart Failure 2012 (Белград, Сербия, 19–22 мая 2012 года), FEBS Congress 2013 «Mechanisms in biology» (Санкт-Петербург, Россия, 6–11 июля 2013 года), IX Международной Крымской конференции «Окислительный стресс и свободнорадикальные патологии» (Судак, Украина, 16–25 сентября 2013 года), VI Всероссийском форуме «Неотложная кардиология-2013» (Москва, Россия, 28–29 ноября 2013 года).

Официальная апробация диссертации была проведена на межлабораторном семинаре НИИЭК ФГБУ «РКНПК» Минздрава РФ (протокол от 19 декабря 2014 года).

### **Публикации**

По теме выполненной диссертационной работы опубликовано 14 работ, в т.ч. 9 в изданиях, рекомендованных ВАК Министерства образования и науки РФ, получен 1 патент РФ на изобретение.

### **Структура и объём диссертации**

Диссертация состоит из введения, списка сокращений, обзора литературы, материалов и методов, результатов, обсуждения результатов, заключения, выводов, практических рекомендаций, списка цитированной литературы и приложений. Работа изложена на 135 страницах машинописного текста, иллюстрирована 13 таблицами и 18 рисунками. Приложения включают 8 таблиц. Список литературы включает в себя 144 отечественных и иностранных источника.

## **МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

**Пептиды апелина.** В работе использовали синтезированный С-концевой фрагмент природного пептида апелина (A12), его протеолитически устойчивые структурные аналоги (АП-AIV) и функциональный антагонист APJ рецептора (AV) (табл. 1). Пептиды были получены путем автоматического твердофазного синтеза на пептидном синтезаторе фирмы Applied Biosystems 431A (Германия). Конечные продукты очищены методом высокоэффективной жидкостной хроматографии до 98%-ной чистоты и охарактеризованы с помощью <sup>1</sup>H-ЯМР-спектроскопии и масс-спектрометрии. Синтез, очистка и идентификация

химической структуры пептидов были осуществлены сотрудниками лаборатории синтеза пептидов ФГБУ «РКНПК».

**Таблица 1.** Апельин-12 и его структурные аналоги.

Формула пептида	М.в.	Обозн.
H-Arg-Pro-Arg-Leu-Ser-His-Lys-Gly-Pro-Met-Pro-Phe-OH	1422,7	A12
H-(N <sup>ω</sup> Me)Arg-Pro-Arg-Leu-Ser-His-Lys-Gly-Pro-Nle-Pro-Phe-OH	1418,7	АII
H-(N <sup>ω</sup> Me)Arg-Pro-Arg-Leu-Ser-His-Lys-Gly-Pro-Nle-Pro-Phe-NH <sub>2</sub>	1417,7	АIII
H-(N <sup>G</sup> NO <sub>2</sub> )Arg-Pro-Arg-Leu-Ser-His-Lys-Gly-Pro-Nle-Pro-Phe-NH <sub>2</sub>	1448,7	АIV
H-Arg-Pro-Arg-Leu-Ser-His-Lys-Gly-Pro-Met-Pro-dAla-OH	1346,6	AV

Модификации в структуре природного пептида A12 выделены жирным шрифтом.

**Животные.** В опытах использовали самцов крыс Wistar весом 290–340 г. Животные содержались в контролируемых условиях вивария при естественном световом цикле. Животных использовали в соответствии с Европейской конвенцией о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (№ 123 от 18 марта 1986 года, Страсбург).

**Модель глобальной ишемии и реперфузии изолированного сердца крысы.** Для перфузии использовали раствор Кребса-Хензеляйта (РКХ, состав в мМ: NaCl 118,0; KCl 4,7; CaCl<sub>2</sub> 3,0; Na<sub>2</sub>EDTA 0,5; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,2; MgSO<sub>4</sub> 1,2; NaHCO<sub>3</sub> 25,0; глюкоза 11,0), насыщенный карбогеном (95% O<sub>2</sub> и 5% CO<sub>2</sub>), pH 7,4±0,1 при 37°C. В контрольной группе животных после перфузии по Нийли (при постоянном давлении наполнения левого предсердия 15 мм рт. ст. и среднем перфузионном давлении в аорте 60 мм рт. ст.) осуществляли 5-минутную инфузию РКХ по Лангендорфу с постоянной скоростью 4 мл/мин и подвергали сердца глобальной нормотермической (37°C) ишемии в течение 35 мин, затем следовала 5-минутная ретроградная перфузия по Лангендорфу со скоростью 4 мл/мин и реперфузия по Нийли в течение 25 мин. Пептиды вводили в составе РКХ в диапазоне концентраций 35–560 мкМ либо до ишемии (A12и, АII – AV), либо при возобновлении реперфузии (A12p). Ингибитор NO-синтаз L-NAME (100 мкМ) вводили в составе РКХ перед глобальной ишемией.

**Региональная ишемия и реперфузия сердца крысы in vivo.** Региональную ишемию моделировали окклюзией передней нисходящей коронарной артерии (ПНА) у наркотизированных 20% уретаном животных (1200 мг/кг веса в/б) в условиях искусственной вентиляции легких воздухом (дыхательный аппарат KTR-5, Hugo Sacks Elektronik). В контрольной группе после периода стабилизации гемодинамических показателей проводили

40-мин окклюзию ПНА, а затем восстанавливали коронарный кровоток в течение 60 мин. Пептиды вводили внутривенно болюсно одновременно с началом реперфузии (A12, AII – AV в диапазоне доз 35–700 нмоль/кг веса), в контроле вводили физиологический раствор в эквивалентном объеме. В опытах с ингибитором NO-синтаз L-NAME вводили внутривенно болюсно в дозе 10 мг/кг веса крысы за 10 мин до окончания ишемии.

**Оценка размеров ИМ.** Для гистохимической локализации зоны риска (ЗР) и ИМ использовали метод окрашивания поперечных срезов левого желудочка (ЛЖ) 2,3,5-трифенилтетразолий хлоридом (ТФТ) в 0,1 М фосфатном буфере (рН 7,4 при 37°C). Окрашенные срезы ЛЖ сканировали с обеих сторон на сканере Epson Perfection 2480 (Япония) и взвешивали для определения массы ЛЖ. Площади ИМ и ЗР определяли методом компьютерной планиметрии, используя программу Imagecal, и рассчитывали отношения зоны риска к весу левого желудочка (ЗР/ЛЖ) и зоны инфаркта миокарда к зоне риска (ИМ/ЗР) в %.

**Приготовление безбелковых экстрактов ткани сердца.** Замороженную ткань гомогенизировали в холодной 6%  $\text{HClO}_4$  (10 мл/г ткани) в гомогенизаторе Ultra-Turrax T25. Белки осаждали центрифугированием при  $2800 \times g$  в течение 10 минут при 4°C. Супернатанты нейтрализовали 5 М  $\text{K}_2\text{CO}_3$  до рН 7,4. Осадок  $\text{KClO}_4$  отделяли центрифугированием в тех же условиях. Сухой вес гомогенизированной ткани определяли после высушивания образцов в течение суток при 110°C.

**Определение метаболитов энергетического обмена.** Содержание адениннуклеотидов (АТФ, АДФ и АМФ), фосфокреатина (ФКр), креатина (Кр) и лактата определяли в безбелковых экстрактах изолированного сердца или ЗР сердца крыс *in vivo* стандартными энзиматическими методами на спектрофотометре Shimadzu UV-1800 (Япония) и выражали в мкмоль/г сухого веса.

**Оценка повреждения мембран кардиомиоцитов.** В опытах на перфузируемом сердце крысы определяли активность лактатдегидрогеназы (ЛДГ) в миокардиальном оттоке в течение 5 мин перед ишемией (исходное состояние) и в течение первых 5 мин реперфузии спектрофотометрически (Shimadzu UV-1800, Япония) при  $\lambda = 340$  нм и 25°C, используя в качестве субстрата пируват. Активность маркеров некроза – МВ фракции креатинкиназы (МВ-КК) и ЛДГ – в плазме крови крыс *in vivo* перед окклюзией ПНА и в конце реперфузии определяли спектрофотометрически при  $\lambda = 340$  нм, используя наборы фирмы BioSystems (Испания).

**Определение активности антиоксидантных ферментов и содержания малонового диальдегида (МДА) в сердце крысы.** Активности Cu/Zn супероксиддисмутазы (Cu/Zn СОД), каталазы (КАТ), Se-содержащей глутатионпероксидазы (ГП) определяли в



супернатанте ( $1000\times g$  и  $4^{\circ}C$  в течение 15 мин) гомогенатов изолированного сердца или ЗР сердец крыс *in vivo* стандартными методами на спектрофотометре Hitachi-557 (Япония). Содержание вторичного продукта свободнорадикального окисления липидов – МДА – в ткани сердца крысы определяли по реакции с 2-тиобарбитуровой кислотой в кислой среде по количеству образовавшегося триметинового комплекса (Ланкин В.З.и др., 2005).

#### **Оценка влияния пептидов на активность коммерческих ферментов СОД и КАТ.**

Коммерческие препараты СОД из бычьих эритроцитов и КАТ из бычьей печени (Sigma-Aldrich, США) растворяли в 50 мМ фосфатном буфере pH 7,4 до активности ферментов 163 ед/мл и 463 ед/мл соответственно. В раствор, содержащий ферменты, вводили пептиды А12 или АП в 50 мМ фосфатном буфере pH 7,4 до конечных концентраций 0,01мМ, 0,1мМ и 1 мМ и инкубировали полученные смеси при  $4^{\circ}C$  в течение 24 часов. После окончания инкубации активность СОД и КАТ определяли приведенными выше методами.

**Регистрация АФК в перфузате.** Спиновую ловушку 5,5-диметил-1-пирролин-N-оксид (ДМПО) добавляли до концентрации 100 мМ к аликвотам миокардиального оттока перфузируемого сердца крысы, собранного на 20-й мин исходного состояния и на 1-й, 3-й и 5-й мин реперфузии. Спектры ЭПР регистрировали на спектрометре X-диапазона типа E-109E фирмы “Varian” (США) на уровне СВЧ-мощности 10 мВт; частота СВЧ-поля спектрометра составляла 9,15 ГГц. Сканирование магнитного поля осуществляли в области  $g=2,0028$ .

**Статистическая обработка результатов исследования.** Использован пакет программ SigmaPlot 11.2 (SysStat, США). Значения выражены как среднее значение  $\pm$  стандартная ошибка среднего значения ( $M \pm m$ ). Различия между группами подтверждали статистически, применяя дисперсионный анализ (ANOVA), методом множественных сравнений с помощью критерия Ньюмена-Кейлса. При сравнении нескольких групп с контролем использовали t-критерий Стьюдента с поправкой Бонферрони. Статистически значимыми эти отличия считали при  $p<0,05$ . Для оценки эффективности защиты сердца от ишемического и реперфузионного повреждения исследуемыми пептидами был использован непараметрический критерий – ранг (С. Гланц, 1998).

## **РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ**

### **1. Защитное действие структурных аналогов апелина на ишемизированное изолированное сердце крысы.**

Инфузия РКХ с природным пептидом А12 или его структурными аналогами АП-AV в диапазоне концентраций 35–560 мкМ перед глобальной ишемией улучшала восстановление

интенсивности сократительной функции (ИСФ) и показателей насосной функции – минутного (МО) и аортального объемов (АО) перфузируемого работающего сердца крысы при реперфузии (табл.2). Наиболее эффективное восстановление большинства показателей функции сердца обеспечивала концентрация 140 мкМ, которую использовали при дальнейших исследованиях.

**Таблица 2.** Влияние инфузии РКХ с 140 мкМ пептидом А12 или его структурными аналогами АII-V на восстановление функции изолированного сердца в конце реперфузии.

Параметр восст. функции	Исх	К	А12	АII	АIII	АIV	AV
ИСФ, мм рт.ст./мин	31231 ±347	14991 ±313 <sup>a</sup>	23476 ±125 <sup>аб</sup>	23468 ±219 <sup>аб</sup>	24980 ±929 <sup>аб</sup>	24987 ±937 <sup>аб</sup>	20033 ±930 <sup>абвгде</sup>
АО, мл/мин.	26±3	1±1 <sup>a</sup>	14±1 <sup>аб</sup>	15±2 <sup>аб</sup>	17±1 <sup>абв</sup>	17±1 <sup>абв</sup>	10±1 <sup>абвгде</sup>
МО, мл	44±3	14±1 <sup>a</sup>	31±1 <sup>аб</sup>	31±2 <sup>аб</sup>	33±1 <sup>аб</sup>	33±1 <sup>аб</sup>	25±2 <sup>абвгде</sup>
УО, мкл	145±5	58±1 <sup>a</sup>	106±1 <sup>аб</sup>	112±3 <sup>аб</sup>	119±3 <sup>абв</sup>	119±3 <sup>абв</sup>	94±5 <sup>абвгде</sup>
R <sub>диаст</sub> , мм рт.ст.	-3±1	9±1 <sup>a</sup>	2±1 <sup>аб</sup>	2±1 <sup>аб</sup>	1±1 <sup>аб</sup>	1±1 <sup>аб</sup>	4±1 <sup>абде</sup>

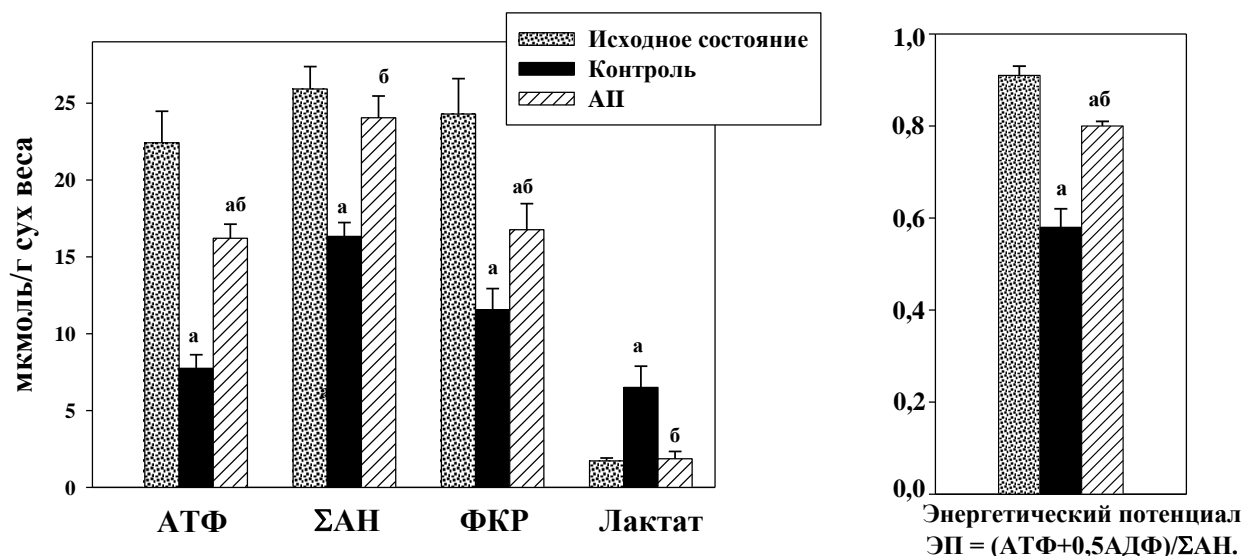
Данные представлены как  $M \pm m$ . Исх – исходное состояние, К – контроль. Достоверно отличается ( $p < 0,05$ ) от: а – исходного состояния, б – контроля, в – А12и (А12), г – АII, д – АIII, е – АIV.

Инфузия структурных аналогов АII или АIII до ишемии снижала повреждение мембран постишемических кардиомиоцитов, подтвержденное уменьшением активности ЛДГ в миокардиальном оттоке в среднем в 1,9 раза по сравнению с контролем до значений, сопоставимых со значениями в группе А12.

Влияние природного пептида А12 и его аналогов АII–АIV на метаболическое состояние реперфузированных сердец было практически одинаковым. Эти пептиды значительно улучшали восстановление АТФ и ФКр, увеличивали сохранение  $\Sigma$ АН и энергетического потенциала (ЭП) в постишемических кардиомиоцитах, а также снижали содержание лактата в сердце по сравнению с контролем до исходного значения. В качестве примера на рис. 1 показаны изменения в содержании метаболитов в сердце крысы в конце реперфузии под действием аналога АII по сравнению с контролем.

Таким образом, прямое влияние структурных аналогов природного пептида А12 на изолированное сердце заключалось в увеличении восстановления функции сердца, улучшении его энергетического состояния и уменьшении повреждения клеточных мембран при реперфузии. По эффективности кардиозащиты модифицированные аналоги А12 не

отличались от природного пептида. Однако замена С-концевого остатка фенилаланина, являющегося структурным элементом эпитопа, ответственного за связывание апелина с APJ рецептором, ухудшало метаболическое и функциональное восстановление сердца по сравнению с аналогами АII–AIV. Преимущества структурных аналогов A12 были выявлены на модели острого ИМ у крыс *in vivo*.



**Рис. 1.** Влияние структурного аналога АII на метаболическое состояние изолированного перфузированного сердца. Данные представлены как  $M \pm m$ .

## 2. Защитное действие структурных аналогов апелина при региональной ишемии и реперфузии сердца крысы *in vivo*.

На данной модели введение оптимальной дозы A12 (350 нмоль/кг веса крысы) эффективно ограничивало размеры ИМ и уменьшало повреждение сарколеммы кардиомиоцитов в ЗР к окончанию реперфузии по сравнению контролем.

Величина ЗР при введении различных доз A12 и структурных аналогов АII–AV достоверно не отличалась от контрольной и в среднем составляла  $38,7 \pm 0,6\%$  от веса ЛЖ. Гистохимическая оценка размеров ИМ показала, что структурные аналоги АII (35, 70, 350, 700 нмоль/кг), АIII (70, 350, 700 нмоль/кг) и AIV (35, 70 нмоль/кг) достоверно ограничивали ИМ по сравнению с контролем. Введение аналогов AIV и AV в дозе 350 нмоль/кг не обеспечивало достоверного снижения величины ИМ по сравнению со значением в контроле. По ограничению размеров ИМ эффективность защиты пептидами снижалась в ряду: АII(700) > A12(350) > АIII(70) > AIV(35) > АII (350).

Под действием структурных аналогов АII (70, 350, 700 нмоль/кг), АIII (70, 350 нмоль/кг), AIV (70 нмоль/кг) и AV(350) активности МВ-КК и ЛДГ в плазме крови крыс к

окончанию реперфузии достоверно снижались по сравнению с контролем. Способность пептидов уменьшать активность МВ-КК снижалась в следующем ряду: АП(350)>А12(350)>АП(70)>АП(350)>АIV(70), а активность ЛДГ – в ряду А12(350)>АП(350)>АП(35)>АП(350)>АП(70).

Для оценки степени уменьшения ишемического и реперфузионного повреждения сердца пептидами был использован непараметрический критерий – ранг, увеличение которого отвечает снижению их защитной способности. В табл.3 представлены суммарные ранги экспериментальных групп, учитывающие способность этих соединений ограничивать размеры ИМ и уменьшать активность маркеров некроза. Выяснено, что при использовании данной экспериментальной модели наиболее эффективными кардиопротекторами являются природный пептид А12 и его структурные аналоги АП и АП в дозе 350 нмоль/кг, а потенциальный антагонист АР1 рецептора АV обладает сниженным защитным действием. В остальных группах более высокие ранги свидетельствовали либо о меньшем ограничении размеров ИМ, либо о высокой активности МВ-КК и ЛДГ в плазме.

**Таблица 3.** Оценка эффективности снижения необратимого повреждения миокарда пептидами.

Группа	А12 (350)	АП (35)	АП (70)	АП (350)	АП (700)	АП (70)	АП (350)	АП (700)	АIV (35)	АIV (70)	АIV (350)	АV (350)
Ранг	<b>5</b>	21	18	<b>11</b>	13	16	<b>11</b>	31	26	23	34	25

В скобках указана доза пептида в нмоль/кг веса.

Введение А12 в дозе 350 нмоль/кг вызывало значительное снижение систолического артериального давления (САД) и частоты сердечных сокращений (ЧСС) на первых минутах реперфузии в среднем на 40% от исходных значений. Использование структурных аналогов АП и АП в такой же дозе вызывало существенно меньшие нарушения гемодинамики: в среднем на 13% и 8% для САД и ЧСС соответственно. Эти данные свидетельствуют о преимуществах использования пептидов АП и АП по сравнению с А12.

В опытах с аналогом АП было обнаружено, что с увеличением дозы его способность ограничивать размеры ИМ уменьшается (рис. 2). В тоже время при введении таких же доз АП наблюдалось снижение размеров ИМ. Из этого следует, что для исключения потенциальных опасностей, связанных с передозировкой, целесообразно использовать структурный аналог АП в качестве основы для создания лекарственного препарата.

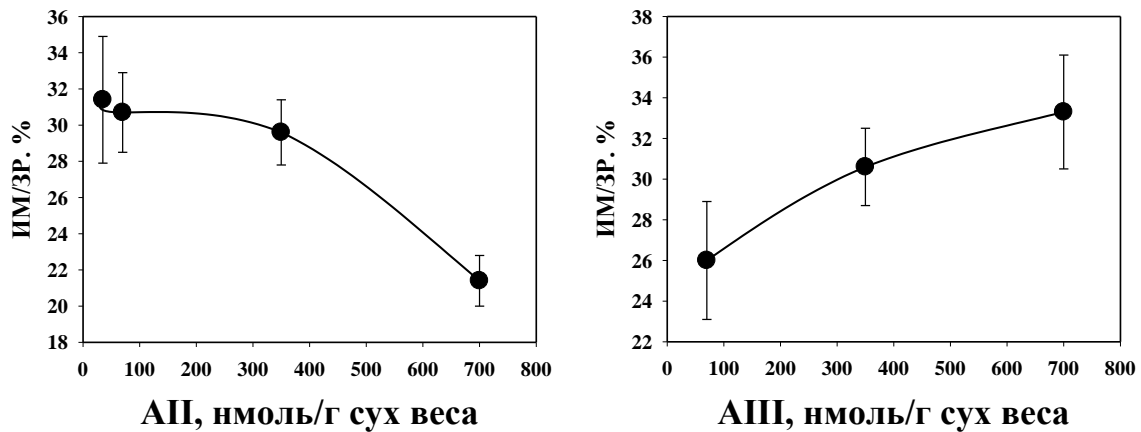


Рис. 2. Дозозависимое действие пептидов АП и АПН на ограничение размеров ИМ.

Для оценки влияния внутривенного введения пептидов на метаболизм ЗР были выбраны природный апелин А12, аналог АП, а также аналог АV в дозе 350 нмоль/кг (рис. 3). Применение структурного аналога АП аналогично А12 увеличивало сохранение  $\Sigma$ АН по сравнению с контролем, достоверно увеличивало ЭП постишемических кардиомиоцитов ЗР по сравнению с А12, а также улучшало восстановление ФКр в ЗР до исходного значения. Также как и А12, АП значительно уменьшал накопление лактата в ЗР по сравнению с контролем, при этом содержание лактата в группе АП было достоверно ниже, чем в группе А12.

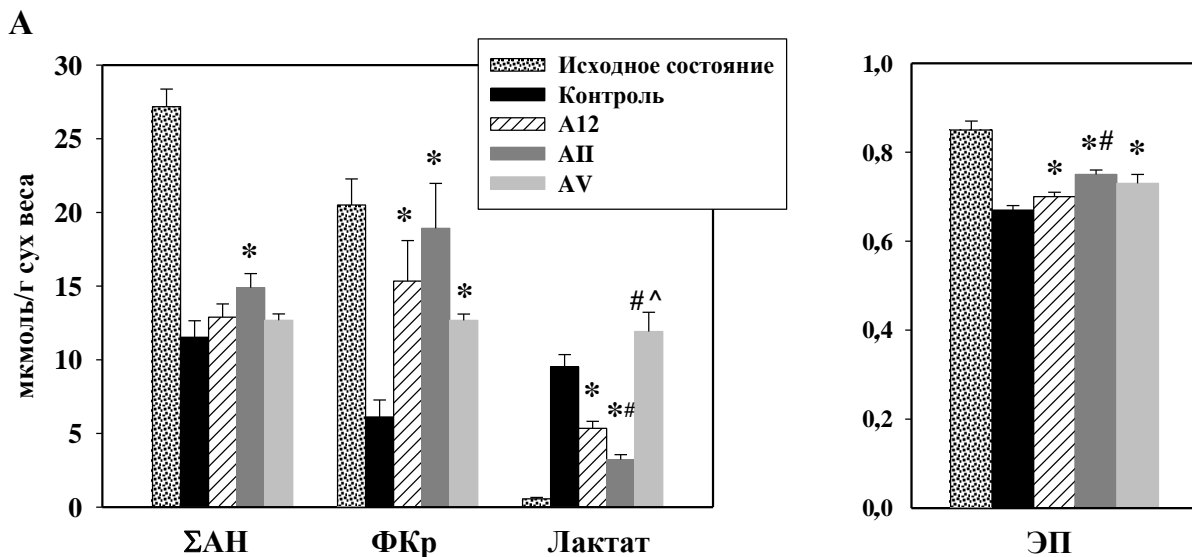
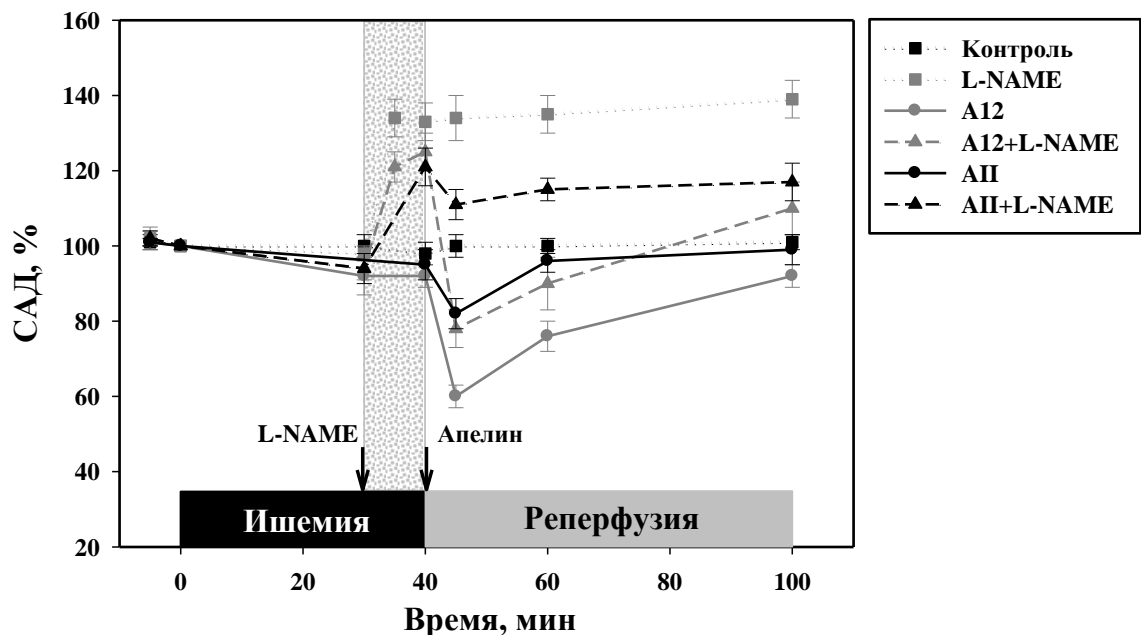


Рис. 3. Влияние природного пептида А12 и его структурных аналогов АП и АV в дозе 350 нмоль/кг на содержание  $\Sigma$ АН, ФКр, лактата и ЭП кардиомиоцитов в ЗР сердца у наркотизированных крыс *in vivo*. Данные представлены как  $M \pm m$  в мкмоль/г сухого веса для серии из 10 опытов. Достоверно ( $p < 0,05$ ) отличается от: \* – контроля, # – А12, ^ – АП.

Введение структурного аналога AV восстанавливало энергетическое состояние ЗР существенно хуже, чем пептид A12 и аналог АП. Таким образом, эффективность метаболической защиты ЗР данными пептидами снижалась в ряду: АП(350)>А12(350)>AV(350).

### 3. Влияние L-NAME на кардиозащитное действие A12 и его структурного аналога АП.

На модели региональной ишемии и реперфузии миокарда у наркотизированных крыс *in vivo* внутривенное введение ингибитора NO-синтаз L-NAME (10 мг/кг) за 10 мин до возобновления коронарного кровотока вызывало увеличение САД в среднем на 40% от исходного показателя, которое сохранялось до конца реперфузии (рис. 4). Введение A12 в дозе 350 нмоль/кг на фоне действия L-NAME снижало САД на стадии ранней реперфузии в достоверно меньшей степени, чем при использовании одного пептида. Аналогичный, но более выраженный, эффект наблюдали и при применении структурного аналога АП (350 нмоль/кг). Таким образом, введение L-NAME уменьшало вазодилатационную способность обоих пептидов, что указывало на блокирование образования NO.



**Рис. 4.** Влияние внутривенного введения пептидов A12 и АП в дозе 350 нмоль/кг на фоне L-NAME (10 мг/кг) на динамику САД при региональной ишемии и реперфузии сердца у наркотизированных крыс. Данные приведены как  $M \pm m$  для серий из 10 опытов.

Гистохимический анализ срезов ЛЖ показал, что во всех экспериментальных группах величина ЗР достоверно не отличалась от контрольной (табл. 4). Внутривенное введение L-NAME (10 мг/кг) не влияло на величину ИМ по сравнению с контролем. В то же время последовательное введение L-NAME и A12 достоверно уменьшало способность пептида ограничивать размер ИМ: размер ИМ был на 26% больше, чем при введении одного A12, хотя и оставался на 25% меньше контрольных значений. Аналогично зона ИМ в группе АП после введения L-NAME была достоверно больше на 21% по сравнению с применением одного пептида и не отличалась от контрольных значений.

**Таблица 4.** Влияние внутривенного введения A12 или его структурного аналога АП в дозе 350 нмоль/кг после введения L-NAME (10 мг/кг) на размеры ЗР и ИМ у наркотизированных крыс.

Экспериментальные группы	ЗР/ЛЖ, %	ИМ/ЗР, %
Контроль	38,6±1,6	40,5±2,1
L-NAME	35,5±0,8	41,0±3,5
A12	41,5±2,7	24,2±1,9 <sup>аб</sup>
A12 + L-NAME	41,7±3,0	30,4±2,1 <sup>абв</sup>
АП	37,1±1,4	29,6±1,8 <sup>аб</sup>
АП + L-NAME	38,0±1,5	35,9±1,9 <sup>бг</sup>

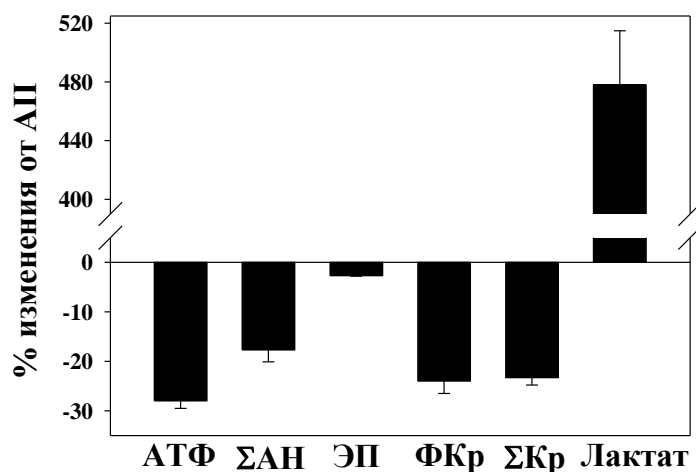
Данные представлены как  $M \pm m$  для серии из 10 опытов. Достоверно ( $p < 0,05$ ) отличается от: <sup>а</sup> – контроля, <sup>б</sup> – A12, <sup>в</sup> – L-NAME, <sup>г</sup> – АП.

Ухудшение кардиопротекторных свойств A12 и АП в присутствии L-NAME сопровождалось достоверным увеличением активности маркеров некроза в плазме по сравнению с использованием одних пептидов. Так активности МВ-КК и ЛДГ были в 1,8 и 1,5 раза выше в группе A12+L-NAME, чем в группе A12 соответственно. Аналогичное увеличение активностей этих ферментов в плазме наблюдали при последовательном внутривенном введении L-NAME и АП по сравнению с применением одного пептида: в 1,4 раза и 1,6 раза для МВ-КК и ЛДГ соответственно.

L-NAME оказывал сходное воздействие на метаболическое состояние ЗР сердца крысы, защищенного пептидами A12 или АП. К окончанию реперфузии при совместном введении L-NAME и АП (рис. 5) было обнаружено достоверное снижение сохранения АТФ и ΣАН, более низкий ЭП постишемических кардиомиоцитов, сниженное восстановление ФКр и уменьшение сохранения ΣКр в ЗР по сравнению со значениями при введении одного пептида АП. Ухудшение энергетического состояния ЗР сопровождалось значительным

увеличением содержания лактата, которое было почти в 5 раз выше, чем при использовании пептида АП.

Полученные данные свидетельствуют о том, что L-NAME снижал кардиопротекторный потенциал А12 и АП, уменьшая вазодилатационную способность пептидов, увеличивая размеры ИМ и активность маркеров некроза в плазме крови, одновременно ухудшая восстановление энергетического состояния ЗР при реперфузии. Аналогичное действие L-NAME наблюдали на модели глобальной ишемии и реперфузии изолированного сердца. Оно проявлялось в достоверном уменьшении восстановления функции сердца, увеличении выхода ЛДГ в миокардиальный эффлюент и ухудшении восстановления аэробного обмена при реперфузии сердца по сравнению с действием пептида А12 или его аналога АП. Эти результаты указывают на NO-зависимую природу защитного действия природного и химически модифицированного С-концевого фрагмента апелина.



**Рис. 5.** Изменение метаболического состояния ЗР сердца крысы, защищенного введением АП, под влиянием L-NAME. Данные представлены как изменение соответствующего показателя в % к его величине в отсутствии L-NAME.

#### 4. Антиоксидантные свойства пептида А12 и его структурного аналога АП.

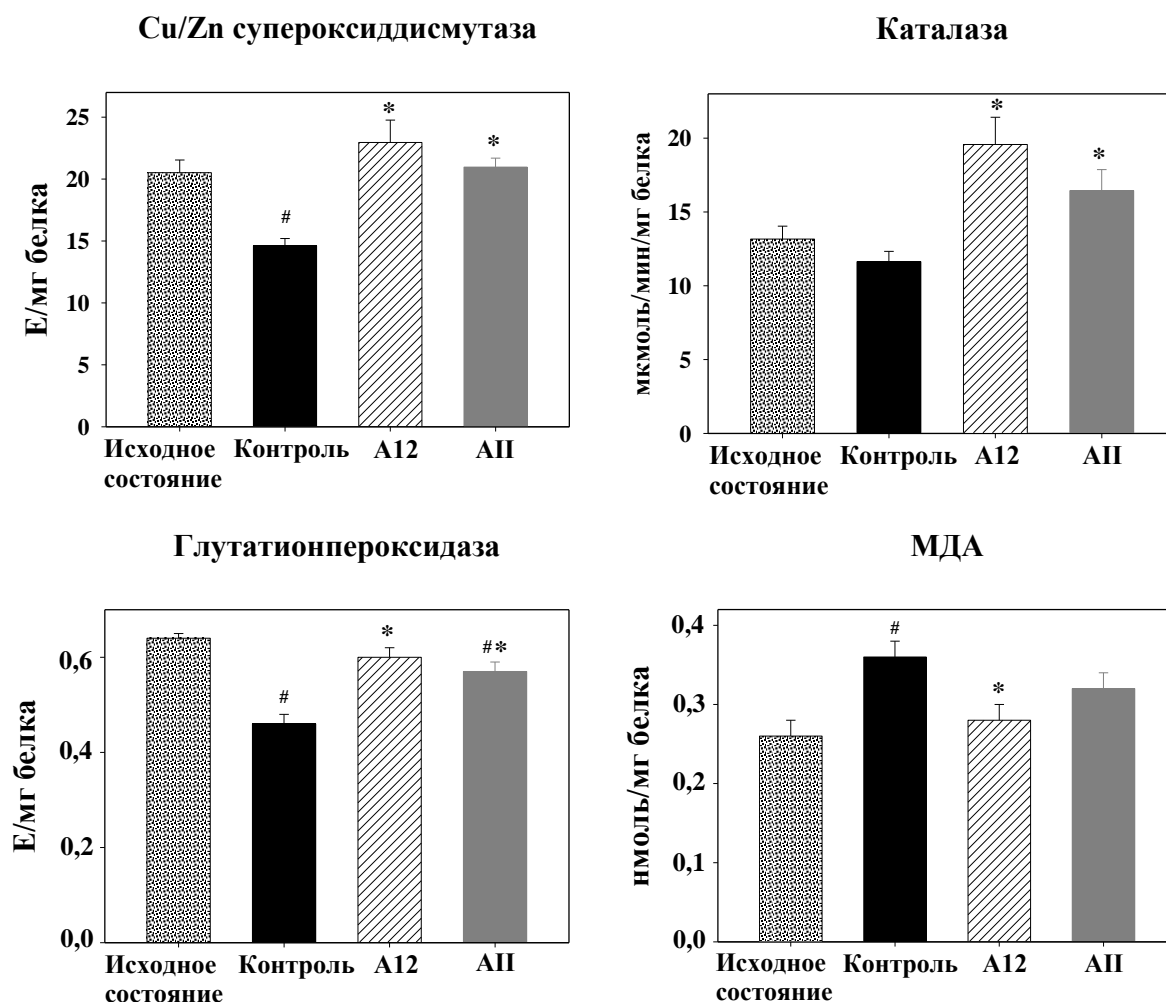
Действие пептидов на изменение антиоксидантного состояния сердца было изучено на обеих моделях ишемического и реперфузионного повреждения. Рис. 6 иллюстрирует влияние А12 и АП на активности Cu/Zn СОД, КАТ и ГП, а также содержание продукта ПОЛ – МДА в ЗР сердца крысы в конце реперфузии.

В контроле к окончанию реперфузии в ЗР активность Cu/Zn СОД и ГП достоверно снижалась, была отмечена тенденция к снижению активности КАТ по сравнению с исходным состоянием. Эти изменения сопровождалось увеличением содержания МДА в ЗР.



Внутривенное введение A12 (350 нмоль/кг) после периода региональной ишемии достоверно увеличивало активность Cu/Zn СОД, КАТ и ГП в ЗР в конце реперфузии по сравнению с контролем, а также снижало образование МДА до величины в исходном состоянии.

Аналогично при внутривенном введении АП (350 нмоль/кг) после периода региональной ишемии в ЗР достоверно увеличивалась активность АО ферментов и была отмечена тенденция к снижению содержания МДА. Принципиально сходные результаты были получены на изолированном перфузируемом сердце крысы. Из приведенных данных следует, что химическое модифицирование пептида A12 не ухудшало его антиоксидантного действия: структурный аналог АП предупреждал снижение активности Cu/Zn СОД, КАТ и ГП, что приводило к уменьшению ПОЛ.



**Рис. 6.** Влияние внутривенного введения пептидов A12 и АП в дозе 350 нмоль/кг на активность антиоксидантных ферментов и содержание МДА в ЗР сердца крысы в конце реперфузии. Данные представлены как  $M \pm m$  для серии из 10 опытов. Достоверно ( $p < 0,05$ ) отличается от: <sup>a</sup> – исходного состояния, <sup>б</sup> – контроля.

Возможность прямого влияния экзогенных пептидов А12 и АП на активность внутриклеточных антиоксидантных ферментов, которое могло быть вызвано повреждением сарколеммы кардиомиоцитов, была изучена в модельных опытах *in vitro*. Коммерческие препараты ферментов СОД и КАТ, активность которых увеличивалась наиболее заметно на обеих экспериментальных моделях, инкубировали с А12 и его аналогом АП. В диапазоне концентраций 0,01–1 мМ пептиды не влияли на активность СОД и КАТ при инкубации с ферментами в течение 24 часов при температуре 4°С по сравнению с активностью ферментов в отсутствии пептидов (табл.5). Полученные данные свидетельствуют о том, что усиление антиоксидантной защиты пептидами, наблюдаемое на моделях ишемического и реперфузионного повреждения сердца, скорее всего, связано не с прямым действием на активность ферментов, а с увеличением экспрессии их генов.

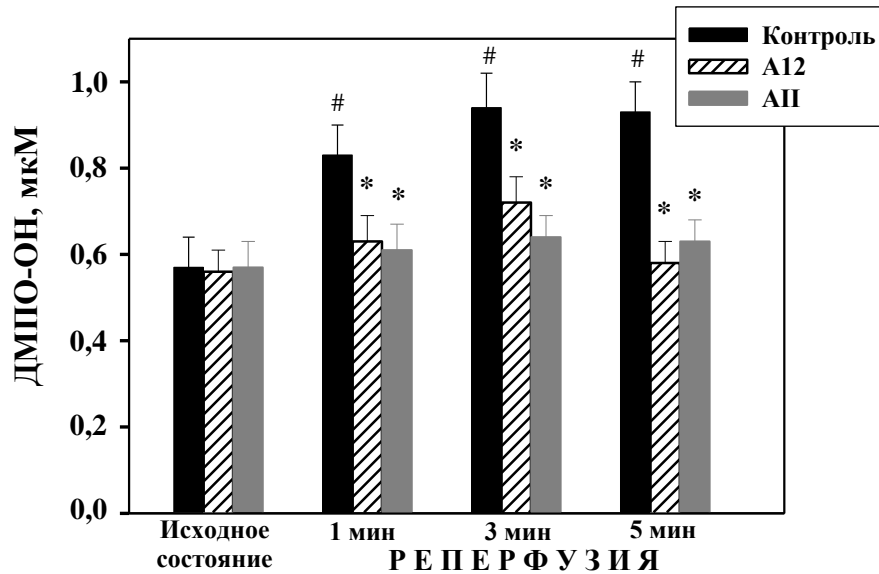
**Таблица 5.** Влияние пептидов А12 и АП на активность коммерческих препаратов СОД и КАТ.

Группа	Концентрация пептидов, мМ	Активность ферментов	
		СОД, Е/мл	КАТ, Е/мл
Контроль	0,0	162,7 ± 1,98	463,1 ± 3,77
А12	0,01	160,7 ± 2,08	476,1 ± 6,52
	0,1	155,9 ± 2,54	456,5 ± 7,53
	1,0	155,6 ± 5,18	459,8 ± 6,24
АП	0,01	158,9 ± 1,85	476,1 ± 6,52
	0,1	161,5 ± 0,78	450,0 ± 19,6
	1,0	162,9 ± 5,29	440,2 ± 8,21

Данные представлены как  $M \pm m$ . СОД – супероксиддисмутаза, КАТ – каталаза.

Действие пептидов на образование АФК было оценено с помощью спиновой ловушки ДМПО на модели изолированного перфузируемого сердца крысы. В опытных сериях перед глобальной ишемией и реперфузией осуществляли инфузию 140 мкМ А12 или АП. В спектрах ЭПР перфузатов регистрировали появление четырёх узких эквидистантных компонентов с соотношением интенсивностей, равным 1:2:2:1, соответствующих спиновому аддукту ДМПО-ОН – соединению, образующемуся при взаимодействии молекул ДМПО и короткоживущих токсичных гидроксильных радикалов. В исходном состоянии до ишемии во всех группах наблюдалась близкая, относительно низкая, концентрация аддукта ДМПО-ОН в

миокардиальном эффлюенте (рис. 7). После ишемии на 1-й, 3-й и 5-й мин реперфузии образование ДМПО-ОН существенно возрастало. Введение перед ишемией пептидов А12 или АП достоверно уменьшало образование аддукта ДМПО-ОН по сравнению с контролем. В этом случае концентрация ДМПО-ОН на стадии ранней реперфузии не отличалась от значений в исходном состоянии в этих группах. Эти результаты свидетельствуют о том, что оба пептида способны снижать генерацию АФК при реперфузии.



**Рис. 7.** Влияние инфузии 140 мкМ А12 и АП на концентрацию аддукта ДМПО-ОН в миокардиальном эффлюенте. Данные представлены как  $M \pm m$  для серий из 8 опытов. Достоверно отличается от: <sup>#</sup> – исходного состояния, <sup>\*</sup> – контроля.

Таким образом, снижение продукции короткоживущих АФК благодаря улучшению антиоксидантного статуса ишемизированного сердца при реперфузии является одним из принципиальных механизмов действия природного пептида А12 и его модифицированного аналога АП.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исследованные в данной работе химически модифицированные аналоги природного пептида А12 характеризуются комплексным воздействием на поврежденный миокард. Они обеспечивают лучшее восстановление функции сердца после ишемического и реперфузионного стресса, снижают необратимые повреждения кардиомиоцитов. Механизмы их действия связаны с улучшением энергетического обмена в реперфузированном сердце, а

также с их антиоксидантными свойствами. Структурные аналоги апелина не уступают по эффективности кардиозащиты природному пептиду A12 на использованных моделях. Мы полагаем, что созданные соединения найдут применение при терапии целого ряда заболеваний, связанных с сердечной патологией.

## **ВЫВОДЫ**

1. Инфузия структурных аналогов АII, АIII и АIV улучшает восстановление функции изолированного перфузируемого сердца крысы после глобальной ишемии, повышает эффективность сохранения энергетического обмена в миокарде и снижает повреждение мембран кардиомиоцитов при реперфузии.
2. Внутривенное введение структурных аналогов АII и АIII значительно уменьшает размеры ИМ и снижает активность МВ-КК и ЛДГ в плазме крови при моделировании региональной ишемии и реперфузии сердца у крыс *in vivo*.
3. Введение структурного аналога АII крысам *in vivo* вызывает меньшие нарушения параметров гемодинамики по сравнению с природным пептидом A12 и улучшает энергетическое состояние ЗР по сравнению с контролем.
4. Включение NO-зависимых механизмов в действие аналога АII подтверждено ухудшением функционального и метаболического восстановления сердца и увеличением необратимого повреждения кардиомиоцитов при реперфузии в присутствии L-NAME на обеих экспериментальных моделях.
5. Увеличение активности Cu/Zn СОД, КАТ и ГП под влиянием структурного аналога АII сопровождается снижением образования АФК и МДА при реперфузии сердца, что свидетельствует об антиоксидантном действии пептида.
6. Результаты указывают на перспективность использования структурных аналогов A12, в частности АII, в качестве основы для создания препаратов, направленных на лечение ИБС.

## **ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ**

Структурный аналог АII может быть использован для создания лекарственного средства, применяющегося при терапии ИБС.

**СПИСОК НАУЧНЫХ РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ****Статьи в рецензируемых журналах из списка ВАК РФ**

1. О.И. Писаренко, В.С. Шульженко, Ю.А. Пелогейкина, И.М. Студнева и др. Влияние экзогенного пептида апелина-12 на восстановление функции и метаболизма изолированного сердца крысы после ишемии. // Кардиология. 2010. Т. 50. №10. С. 44–49.
2. О.И. Писаренко, Л.И. Серебрякова, Ю.А. Пелогейкина, И.М. Студнева и др. Уменьшение реперфузионного повреждения сердца у крыс in vivo пептидом апелином-12. // Бюлл. эксп. биол. мед. 2011. Т. 152. №7. С. 86–89.
3. О.И. Писаренко, Л.И. Серебрякова, Ю.А. Пелогейкина, И.М. Студнева и др. Участие NO-зависимых механизмов действия апелина в защите миокарда от ишемического и реперфузионного повреждения. // Кардиология. 2012. Т. 52. №2. С. 52–58.
4. Ю.А. Пелогейкина, Л.И. Серебрякова, И.М. Студнева, Д.Н. Кхатри и др. Влияние С-концевого фрагмента адипокина апелина на экспериментальное ишемическое и реперфузионное повреждение сердца. // Кардиологический вестник. 2012. Т. 7. №2. С. 29–35.
5. М.В. Сидорова, А.А. Азьмуко, М.Е. Палькеева, А.С. Молокоедов, В.Н. Бушуев, С.Н. Дворянцев, В.С. Шульженко, Ю.А. Пелогейкина, О.И. Писаренко, Ж.Д. Беспалова. Синтез и изучение кардиопротекторных свойств апелина-12 и его структурных аналогов. // Биоорг. химия. 2012. Т. 38. №1. С. 40–51.
6. О.И. Писаренко, Ю.А. Пелогейкина, В.С. Шульженко, И.М. Студнева и др. Влияние ингибирования образования NO на восстановление метаболизма ишемизированного сердца крысы апелином-12. // Биомед. химия. 2012. Т. 58. №6. С. 702–711.
7. Писаренко О.И., Пелогейкина Ю.А., Беспалова Ж.Д., Серебрякова Л.И. и др. Ограничение инфаркта миокарда структурным аналогом пептида апелина-12. // ДАН. 2012. Т. 443. №1. С. 127–129.
8. О.И. Писаренко, Ж.Д. Беспалова, В.З. Ланкин, А.А. Тимошин, Л.И., В.С. Шульженко, Ю.А. Пелогейкина и др. Антиоксидантные свойства апелина-12 и его структурного аналога при экспериментальной ишемии и реперфузии сердца. // Кардиология. 2013. Т. 53. №5. С. 61–67.
9. Пелогейкина Ю.А., Серебрякова Л.И., Цкитишвили О.В., Студнева И.М., Писаренко О.И. Структурные аналоги пептида апелина-12 – потенциальные лекарственные средства для терапии острого коронарного синдрома. // Кардиологический вестник. 2014. Т. 9. №3. С. 54–63.

### Другие издания

10. Pisarenko O.I., Shulzhenko V.S., Pelogeikina Yu.A., Studneva I.M., Khatri D.N. Apelin-12 improves metabolic and functional recovery of rat heart after global ischemia. // Health. 2010. V. 2. №8. P. 927–934.
11. Pisarenko O.I., Pelogeikina Yu.A., Shulzhenko V.S., Studneva I.M. Nitric oxide synthase mediates the apelin-induced improvement of myocardial postischemic metabolic and functional recovery. // Open J. Mol. Integr. Physiol. 2012. V. 2. №2. P. 1–7.
12. Pisarenko O.I., Shulzhenko V.S., Pelogeikina Yu.A., Studneva I.M. Attenuation of myocardial ischemia and reperfusion injury by novel analogues of apelin-12. // Int. J. Pharm. Biomed. Res. 2012. V. 3. №1. P. 16–21.
13. Pisarenko O.I., Serebriakova L.I., Studneva I.M., Pelogeikina Y.A. et al. Effects of structural analogues of apelin-12 in acute myocardial infarction in rats. // J. Pharmacol. Pharmacother. 2013. V. 4. №3. P. 198–203.
14. Pisarenko O.I., Lankin V.Z., Konovalova G.G., Serebryakova L.I., Shulzhenko V.S., Timoshin A.A., Tskitishvili O.V., Pelogeikina Y.A., Studneva I.M. Apelin-12 and its structural analog enhance antioxidant defense in experimental myocardial ischemia and reperfusion. // Mol. Cell. Biochem. 2014.

### Патенты

15. Писаренко О.И., Шульженко В.С., Пелогейкина Ю.А., Палькеева М.Е., Сидорова М.В., Молокоедов А.С., Беспалова Ж.Д., Терещенко С.Н., Масенко В.П. Додекапептиды, обладающие кардиопротекторными свойствами. Патент РФ №2457216 (27.07.2012).

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

Акт – протеин киназа В	КП – коронарный поток
АРJ – апелиновый рецептор	ЛЖ – левый желудочек
Cu/Zn СОД – медь/цинковая супероксиддисмутаза	ЛДГ – лактатдегидрогеназа
ERK (extracellular signal-regulated kinase) – киназа, регулируемая внеклеточными сигналами	МВ-КК – МВ-фракция креатинкиназы
L-NAME – метиловый эфир N <sup>G</sup> -нитро-L-аргинина	МДА – малоновый диальдегид
NO – оксид азота	МО – минутный объем, МО=КП+АО
P <sub>диаст</sub> – диастолическое давление	НАДН – никотинамидадениндинуклеотид восстановленный
PI3K – фосфатидилинозитол-3-киназа	НАДФН – никотинамидадениндинуклеотидфосфат восстановленный
ΣАН – общий пул адениннуклеотидов, ΣАН=АТФ+АДФ+АМФ	ПНА – передняя нисходящая коронарная артерия
АО – аортальный объем	ПОЛ – перекисное окисление липидов
АДФ – аденозиндифосфат	РКХ – раствор Кребса-Хензеляйта
АМФ – аденозинмонофосфат	САД – систолическое артериальное давление
АПФ2 – ангиотензинпревращающий фермент 2	ТФТ – 2,3,5-трифенилтетразолий хлорид
АТФ – аденозинтрифосфат	УО – ударный объем, УО=МО/ЧСС
АФК – активные формы кислорода	ФКр – фосфокреатин
ГП – глутатионпероксидаза	ЧСС – частота сердечных сокращений
ДМПО – 5,5-диметил-1-пирролин-N-оксид	ЭП – энергетический потенциал, ЭП=(АТФ+0,5АДФ)/ΣАН
ЗР – зона риска	ЭПР – электронный парамагнитный резонанс
ИМ – инфаркт миокарда	ЯМР – ядерный магнитный резонанс
ИБС – ишемическая болезнь сердца	
ИСФ – показатель интенсивности сократительной функции, ИСФ=P <sub>разв</sub> ×ЧСС	
КАТ – каталаза	
ΣКр – общий креатин, ΣКр=ФКр+Кр	