

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

©Коллектив авторов

СТРУКТУРНЫЙ АНАЛОГ АПЕЛИНА-12 ПРЕПЯТСТВУЕТ НАРУШЕНИЯМ ЭНЕРГЕТИКИ СЕРДЦА ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ САХАРНОМ ДИАБЕТЕ 1 ТИПА

*И.М. Студнева, О.М. Веселова, И.В. Доброхотов, Л.И. Серебрякова,
М.Е. Палькеева, Д.В. Авдеев, А.С. Молокоедов, М.В. Сидорова, О.И. Писаренко**

Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии им. ак. Е.И. Чазова,
121552, Москва, ул. Академика Чазова, 15а; *эл. почта: olpi@live.ru

Сахарный диабет первого типа (СД1) — наиболее тяжёлая форма диабета, которая характеризуется абсолютной недостаточностью инсулина, вызванной деструкцией бета-клеток поджелудочной железы. Целью данной работы было оценить влияние структурного аналога апеллина-12 ($(N^{\epsilon}Me)Arg-Pro-Arg-Leu-Ser-His-Lys-Gly-Pro-Nle-Pro-Phe-OH$, метилин) на гипергликемию, параметры дыхания митохондрий (МХ) в пермеабилizированных волокнах левого желудочка (ЛЖ) сердца, энергетическое состояние миокарда и повреждение мембран кардиомиоцитов на модели стрептозотоцинового (СТЗ) диабета у крыс. Метилин получали методом твердофазного синтеза с использованием Fmoc-стратегии и очищали с помощью ВЭЖХ. Использовали четыре группы животных: исходное состояние (ИС); контроль (К), диабет (Д) и животных с диабетом, дополнительно получавших метилин (ДМ). Оценивали уровень глюкозы в крови, дыхание митохондрий (МХ) в волокнах ЛЖ, содержание АТФ, АДФ, АМФ, фосфокреатина (PCr) и креатина (Cr) в сердце, активность креатинкиназы-МВ (КК-МВ) и лактатдегидрогеназы (ЛДГ) в плазме крови. Введение метилина крысам, получавшим СТЗ, снижало уровень глюкозы в крови, увеличивало потребление кислорода в состоянии 3 и дыхательный контроль в МХ пермеабилizированных волокон ЛЖ, повышало функциональное связывание митохондриальной КК с окислительным фосфорилированием по сравнению с этими параметрами в группе Д. Под действием метилина у животных, получавших СТЗ, наблюдали повышение содержания PCr и предотвращение потери общего креатина ($\Sigma Cr = PCr + Cr$) в диабетическом сердце, восстановление отношения PCr/АТФ в миокарде и снижение активности КК-МВ и ЛДГ в плазме до исходных значений. Таким образом, метилин предотвращал нарушения биоэнергетики кардиомиоцитов при моделировании СД1.

Ключевые слова: аналог апеллина-12; стрептозотоциновый диабет; сердце крысы; дисфункция митохондрий; энергетическое состояние миокарда

DOI: 10.18097/PBMC20247003135

ВВЕДЕНИЕ

Сахарный диабет 1 типа (СД1) является опасным для здоровья метаболическим заболеванием, которое увеличивает риск многих длительных осложнений. Одним из тяжёлых последствий СД1 является развитие диабетической кардиомиопатии (ДКМП). Современные данные свидетельствуют о том, что ДКМП связана с изменениями в образовании энергии в миокарде, а дисфункция митохондрий (МХ) может играть решающую роль в её патогенезе [1]. Поскольку МХ являются основным клеточным источником АТФ, нарушение их дыхательной функции считается ключевым фактором развития патологических осложнений сердца при диабетических состояниях [2]. Дисфункция МХ при экспериментальном диабете и у пациентов связана не только с нарушением образования и транспорта высокоэнергетических фосфатов, но и с повышенным окислительным стрессом, нарушением гомеостаза кальция, эндотелиальной дисфункцией и ремоделированием внеклеточного матрикса [3]. В связи с этим актуален поиск инновационных стратегий для защиты энергетики сердца от повреждающего воздействия СД1.

Пептид апеллин является эндогенным лигандом трансмембранного рецептора APJ, связанного с G-белком [4]. Система апеллин/APJ играет важную

регуляторную роль в энергетическом обмене различных органов, включая сердце [5]. Помимо этого, апеллин обладает антидиабетической эффективностью — повышает чувствительность к инсулину, увеличивает утилизацию глюкозы и снижает уровень глюкозы в крови [6]. Апеллин-12 представляет собой наименьший фрагмент препропептида апеллина, состоящего из 77 аминокислот, который сохраняет эффективное связывание с рецептором APJ и оказывает мощное кардиопротекторное действие [7]. Мы модифицировали этот пептид и синтезировали несколько его структурных аналогов, обладающих большей стабильностью по отношению к аминок- и карбоксипептидазам и лучшей растворимостью в воде [8]. Тестирование этих фармакологических агонистов рецептора APJ на различных моделях ишемического/реперфузионного повреждения (ИРП) миокарда показало, что пептид ($(N^{\epsilon}Me)Arg-Pro-Arg-Leu-Ser-His-Lys-Gly-Pro-Nle-Pro-Phe-OH$, названный метилином, обладает наибольшей биологической активностью [9]. Действие метилина на сердце при моделировании СД1 остаётся неизученным.

Целью данной работы было изучение влияния метилина на нарушения энергетического обмена в сердце, вызванные введением стрептозотоцина (СТЗ) крысам. Наши результаты показывают, что введение метилина снижает уровень глюкозы в крови,

ДЕЙСТВИЕ МЕТИЛИНА ПРИ СТРЕПТОЗОТОЦИНОВОМ ДИАБЕТЕ У КРЫС

улучшает функцию МХ и энергетическое состояние миокарда, а также уменьшает повреждение мембран кардиомиоцитов у крыс, получавших СТЗ.

МЕТОДИКА

Реагенты

Производные Fmoc-защищённых аминокислот были приобретены у “Novabiochem” (Германия) и “Bachem” (Швейцария). Реагенты для синтеза пептидов были закуплены у компании “Fluka Chemie GmbH” (Швейцария). Ферменты и химические препараты для определения метаболитов и параметров дыхания волокон миокарда были приобретены у “Мерк Лайф Сайенс” (Россия). Растворы готовили с использованием деионизированной воды (“Millipore Corp.”, США).

Синтез и хроматография метилина

Метилин ([MeArg1, NLe10]-апелин12) представляет собой аналог природного апелина-12, у которого N-концевая часть содержит N^α-метилованный Arg1. Эта модификация повышает протеолитическую стабильность пептида. Остаток Met10, который может подвергаться нежелательному окислению, был заменён норлейцином — природной небелковой аминокислотой, устойчивой к окислению кислородом. Метилин синтезировали на 2-хлортритилхлоридной (СТС) смоле (“Iris Biotech GmbH”, Германия) с использованием пептидного синтезатора Tribute-UV (“Protein Technologies Inc.”, США) по стандартному протоколу однократной конденсации N^α-9-флуоренил-метилоксикарбонил-(Fmoc)-аминокислот методом урониевых солей [10]. Аналитическая ВЭЖХ выполнена на хроматографе “Knauer Smartline” (“Knauer”, Германия) на колонке Diasphere-110-5 C18 (4,0×250 мм, 5 мкм, “BioChemMack S&T”, Россия). Препаративную ВЭЖХ проводили на хроматографе “Knauer Well-Chrom” (“Knauer”) на колонке Eurosphere C18 (20×250 мм, 10 мкм). После очистки гомогенность пептида составляла 98,7%. Структура пептида была подтверждена методами протонного магнитного резонанса (¹H-ЯМР) и масс-спектрометрии. Спектры ¹H-ЯМР регистрировали на спектрометре WH-500 Bruker 500 МГц (“Bruker Daltonik GmbH”, Германия) в ДМСО-d₆ при 300 К. Химические сдвиги измерены относительно тетраметилсилана. Данные масс-спектрометрии получали на приборе Amazon (“Bruker Daltonik GmbH”) методом электрораспылительной ионизации (ESI)

Таблица 1. Характеристики метилина

Пептид	Последовательность	М, г/моль	Выход*, %	ESI +, m/z	Растворимость в воде, мг/мл	ВЭЖХ**	
						R _t , мин	Чистота, %
Метилин	H(N ^α Me)Arg-Pro-Arg-Leu-Ser-His-Lys-Gly-Pro-Nle-Pro-Phe-OH	1418,7	65	709,97 ²⁺	>100	12,5	98,7

Примечание. R_t – время удерживания. * – Выход приведён в расчёте на стартовую аминокислоту, присоединённую к полимеру. ** – Аналитическую ВЭЖХ проводили на колонке Diasphere-110-5 C18 (4,0×250 мм, “BioChemMack S&T”, Россия), размер частиц сорбента – 5 мкм; подвижная фаза – буфер А: 0,05 М КН₂РO₄, рН 3,0; буфер Б: 70% ацетонитрил в буфере А. Пептид элюировали градиентом буфера Б в буфере А от 20% до 80% за 30 мин со скоростью 0,75 мл/мин и детекцией при 220 нм.

в режиме регистрации положительных ионов (напряжение на капилляре — 3500 В). Диапазон сканирования масс *m/z* — 70-2200. Структура пептида, данные ВЭЖХ, ¹H-ЯМР и масс-спектрометрии приведены на рисунках S1, S2, S3 и в таблице S1 Дополнительных материалов. Характеристики метилина показаны в таблице 1.

Животные

Крысы-самцы линии Wistar массой 280-290 г (n=40) были получены из Дома животных “Столбовая” Научного центра биомедицинских технологий (Россия). Животных содержали в индивидуальных клетках при температуре 20-25°C с естественным циклом света и темноты и свободным доступом к стандартному гранулированному корму (“Little One”, Россия) и воде в соответствии с санитарно-эпидемиологическими правилами СП 2.2.1.3218-14 “Санитарно-эпидемиологические требования к устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев)” от 29 августа 2014 г. № 51.

Дизайн эксперимента

Перед исследованием всех животных взвешивали. После 24-часового голодания у 10 животных забирали кровь из хвостовой вены для определения исходной концентрации глюкозы и активности креатинкиназы-МВ (КК-МВ) и лактатдегидрогеназы (ЛДГ) в плазме. Затем их наркотизировали 2,2,2-трибромэтанолом (авертин, 1 мг/кг, в/б, “Merck”, Россия) и выделяли сердца для определения показателей энергетического обмена (n=5) и параметров дыхания МХ в волокнах ЛЖ (n=5) (исходное состояние — группа ИС). Оставшихся крыс случайным образом распределяли на три группы по 10 крыс в каждой: диабетическую (Д), Д+метилин (ДМ) и контрольную (К). СД1 инициировали однократной инъекцией СТЗ (60 мг/кг, в/в) [11]. О развитии диабета судили по повышению уровня глюкозы в крови до 12 мМ и выше через три дня после инъекции СТЗ; развитие СД1 отмечено у всех животных. Группа ДМ получала однократную инъекцию СТЗ (60 мг/кг, в/в) и метилин (150 нмоль/кг/сут, в/б) в течение 2 недель. Животным этой группы метилин вводили, начиная с третьего дня после инъекции СТЗ. Метилин растворяли в 0,02% ДМСО в физиологическом растворе непосредственно перед применением. Доза метилина была выбрана на основе наших

предварительных данных. Крысы контрольной группы (К) получали однократную в/в инъекцию 0,1 М цитратного буфера pH 4,5 (растворитель СТЗ) и, начиная с третьего дня эксперимента, 0,02% ДМСО в физиологическом растворе в течение 2 недель. Массу тела и уровень глюкозы в крови животных К, Д и ДМ групп определяли после первой недели и в конце эксперимента. После 17-дневного исследования образцы крови собирали из хвостовой вены для определения активности КК-МВ и ЛДГ в плазме. У пяти крыс из каждой группы после анестезии авертином (1 мг/кг, в/б) выделяли сердце и замораживали его в жидком азоте с использованием щипцов Волленберга для последующего анализа метаболитов. Сердца остальных пяти животных немедленно использовали для определения параметров дыхания МХ в волокнах ЛЖ. Схема экспериментального протокола показана на рисунке 1.

Дыхание МХ в пермеабилizированных волокнах миокарда

Пермеабилizированные сапонином волокна из ЛЖ сердца крысы получали по модифицированному методу [12]. Параметры дыхания волокон ЛЖ оценивали с использованием субстратов 10 мМ глутамата и 5 мМ малата с помощью системы Oxygraph plus ("HansaTech Instr.", Великобритания) и выражали в нмоль O_2 /мин/мг сухого веса. Состояние дыхания 3 достигали добавлением 2 мМ ADP. Сухую массу волокон определяли после сушки в течение ночи при 95°C. Параметры дыхания каждого образца волокон ЛЖ измеряли дважды. Дыхание в состоянии 2 оценивали по скорости потребления кислорода (ПК) после добавления 10 мМ глутамата и 5 мМ малата без ADP. Функцию митохондрий оценивали по величине коэффициента дыхательного контроля (КДК), который определяли как отношение скорости ПК в состоянии 3 к скорости ПК в состоянии 2. Целостность внешней мембраны МХ оценивали добавлением 10 мкМ цитохрома c после максимальной стимуляции дыхания 2 мМ ADP и выражали

отношением $V_{\text{cyt c}}/V_{\text{ADP}}$ в процентах. Степень функционального сопряжения митохондриальной креатинкиназы (мт-КК) с окислительным фосфорилированием (ОФ) оценивали при добавлении 30 мМ креатина (Cr) к волокнам в присутствии субмаксимальной концентрации ADP 0,1 мМ и рассчитывали как отношение $(V_{\text{Cr}} - V_{\text{ADP}})/V_{\text{ADP}}$ в процентах [13].

Обработка ткани миокарда и анализ метаболитов

Безбелковые экстракты из замороженного сердца готовили с использованием холодной 6% $HClO_4$ (1:10 масса/объем) и гомогенизатора Ultra-Turrax T-25 ("IKA", Германия) [9]. Сухую массу ткани сердца после экстракции 6% $HClO_4$ определяли взвешиванием после сушки в течение ночи при 110°C. Концентрации АТР, ADP, AMP, фосфокреатина (PCr) и Cr в нейтрализованных экстрактах ткани сердца определяли модифицированными ферментативными методами [14] с использованием спектрофотометра UV-1800 ("Shimadzu", Япония). Концентрацию глюкозы в крови натощак измеряли с помощью глюкометра Accu-Check Instant ("Boehringer Mannheim", Германия).

Определение активности КК-МВ и ЛДГ в плазме

Образцы крови, собранные в исходном состоянии и в конце эксперимента, использовали для определения активности КК-МВ и ЛДГ в плазме. Активность ЛДГ определяли ферментативно с пируватом в качестве субстрата на спектрофотометре UV-1800 при $\lambda=340$ нм [15]. Активность КК-МВ определяли иммуноферментным методом, используя стандартные наборы "BioSystems S.A." (Испания).

Статистический анализ

Все данные выражены как средние \pm стандартная ошибка среднего значения (M+SEM). Результаты проанализированы с помощью однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с использованием множественного критерия Бонферрони для оценки

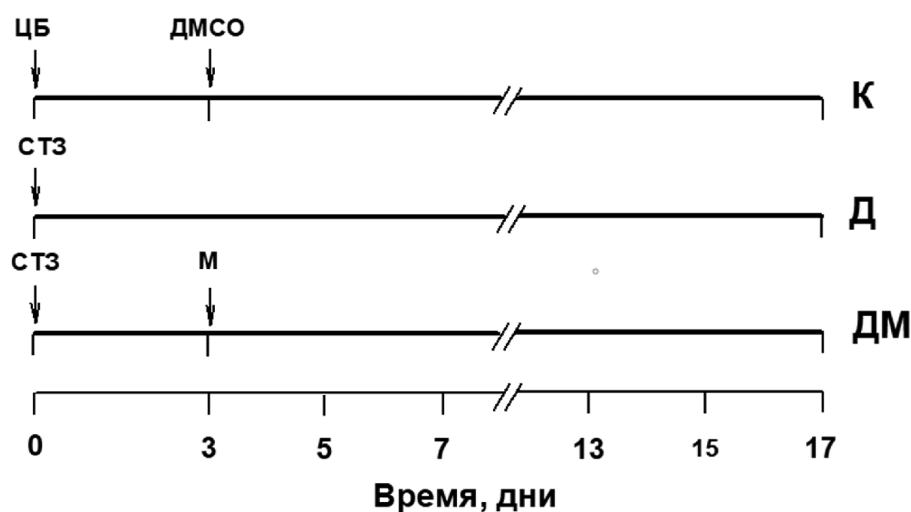


Рисунок 1. Схема протокола опытов. К – контрольная группа; Д – диабетическая группа (в/в инъекция СТЗ (60 мг/кг) в 0,1 М цитратном буфере pH 4,5); ДМ – группа диабетических крыс (СТЗ 60 мг/кг, в/в), получавших метилин (150 нмоль/кг/сут, в/б) в течение 2 недель, начиная с 3 дня после введения СТЗ. ЦБ – 0,1 М цитратный буфер pH 4,5; СТЗ – стрептозотоцин; М – метилин.

ДЕЙСТВИЕ МЕТИЛИНА ПРИ СТРЕПТОЗОТОЦИНОВОМ ДИАБЕТЕ У КРЫС

различий между более чем двумя группами. Для сравнения двух групп использовался *t*-критерий Стьюдента. Данные анализировали с использованием GraphPad Prism версии 5.00 для Windows ("GraphPad Software", США). Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Масса тела и уровень глюкозы в крови

В исходном состоянии масса крыс достоверно не различалась между группами (табл. 2). В контрольной группе за период наблюдения происходило прогрессивное увеличение массы тела животных. У крыс группы Д после первой недели и в конце исследования средняя масса тела была на 7,4% и 8,5% соответственно ниже, чем в исходном состоянии ($p < 0,001$), а также достоверно ниже по сравнению с соответствующим значением в контроле ($p < 0,001$). Введение метилина крысам, получавшим СТЗ, лишь незначительно увеличивало прибавление массы тела. Так, различий в этом показателе между исходным состоянием и первой неделей исследования не было обнаружено. Однако

значимые различия между контролем и группой Д сохранялись в конце первой недели и в конце исследования ($p < 0,02$ и $p < 0,01$ соответственно).

Введение СТЗ достоверно повышало уровень глюкозы в крови по сравнению с контролем в течение всего эксперимента. После 17-дневного исследования концентрация глюкозы в крови у животных группы Д была более чем в 3 раза выше исходного уровня и составила $21,0 \pm 0,7$ мМ по сравнению с $6,4 \pm 0,3$ мМ ($p < 0,001$). Под действием метилина уровень экспериментальной гипергликемии у животных, получавших СТЗ снижался. К концу исследования этот показатель в группе ДМ был достоверно ниже, чем в группе Д ($p < 0,05$).

Активность КК-МВ и ЛДГ в плазме крови

Активность КК-МВ и ЛДГ у крыс, получавших СТЗ, достоверно повышалась после 17-дневного исследования в среднем в 2,0 и 1,8 раза соответственно по сравнению с исходным состоянием и контролем (рис. 2). Введение метилина предотвращало повышение уровня этих ферментов в крови. В конце эксперимента в группе ДМ эти показатели не отличались от нормальных значений.

Таблица 2. Изменения массы тела и концентрации глюкозы в крови животных изученных групп в течение эксперимента

Группа	Исходное состояние (ИС)	7 дней	17 дней
Масса тела, г			
К	$286,9 \pm 2,4$	$299,3 \pm 6,0$	$313,3 \pm 11,6^{\wedge\wedge}$
Д	$287,3 \pm 3,8$	$260,2 \pm 5,4^{\wedge\wedge\wedge\wedge\wedge\wedge\wedge}$	$234,2 \pm 8,1^{\wedge\wedge\wedge\wedge\wedge\wedge\wedge\wedge\wedge}$
ДМ	$284,5 \pm 4,5$	$267,5 \pm 7,7^{**}$	$251,9 \pm 10,9^{\wedge\wedge\wedge\wedge\wedge}$
Глюкоза крови, мМ			
К	$6,1 \pm 0,2$	$5,9 \pm 0,2$	$6,0 \pm 0,3$
Д	$6,4 \pm 0,3$	$27,6 \pm 1,8^{\wedge\wedge\wedge\wedge\wedge\wedge\wedge\wedge\wedge}$	$21,0 \pm 0,7^{\wedge\wedge\wedge\wedge\wedge\wedge\wedge\wedge\wedge\wedge\wedge}$
ДМ	$5,7 \pm 0,2$	$25,0 \pm 2,0^{\wedge\wedge\wedge\wedge\wedge\wedge\wedge\wedge\wedge}$	$17,6 \pm 1,3^{\wedge\wedge\wedge\wedge\wedge\wedge\wedge\wedge\wedge\wedge\wedge\wedge\wedge}$

Примечание. Данные представлены как $M \pm m$ для групп из 10 животных. К – контроль; Д – крысы, получавшие СТЗ; ДМ – крысы, получавшие СТЗ и метилин. ** – $p < 0,02$ по сравнению с К; *** – $p < 0,01$ по сравнению с К; **** – $p < 0,001$ по сравнению с К; $\wedge\wedge\wedge\wedge\wedge\wedge\wedge\wedge\wedge$ – $p < 0,01$ по сравнению с ИС; $\wedge\wedge\wedge\wedge\wedge\wedge\wedge\wedge\wedge\wedge\wedge\wedge\wedge$ – $p < 0,001$ по сравнению с ИС; # – $p < 0,05$ по сравнению с Д; ++ – $p < 0,02$ по сравнению с первой неделей; +++ – $p < 0,01$ по сравнению с первой неделей.

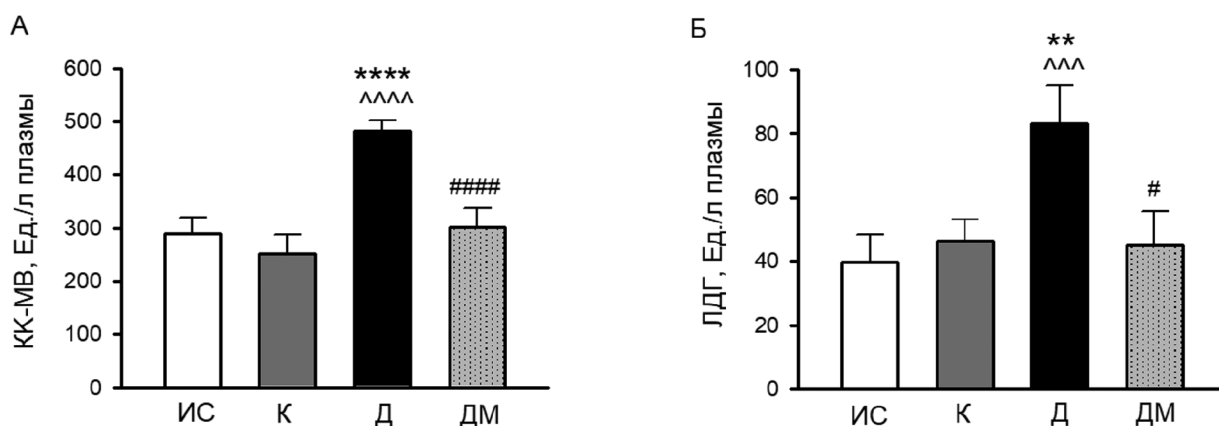


Рисунок 2. Активность креатинкиназы-МВ (КК-МВ, А) и лактатдегидрогеназы (ЛДГ, Б) в плазме крови крыс. Значения представляют собой $M \pm m$ для групп из 10 животных. ИС – исходное состояние; К – контроль; Д – крысы, получавшие СТЗ; ДМ – крысы, получавшие СТЗ и метилин. ** – $p < 0,02$ по сравнению с К; **** – $p < 0,001$ по сравнению с К; $\wedge\wedge\wedge\wedge\wedge\wedge\wedge\wedge\wedge$ – $p < 0,01$ по сравнению с ИС; $\wedge\wedge\wedge\wedge\wedge\wedge\wedge\wedge\wedge\wedge\wedge\wedge\wedge$ – $p < 0,001$ по сравнению с ИС; # – $p < 0,05$ по сравнению с Д; #### – $p < 0,001$ по сравнению с Д.

Параметры дыхания волокон миокарда,
скинированных сапонином

После 17-дневного эксперимента не было никаких различий в состоянии 2, состоянии 3, КДК и степени функциональной связи мт-КК с ОФ между контрольной группой и этими показателями в исходном состоянии (рис. 3). У крыс, получавших СТЗ, было отмечено снижение дыхания в состоянии 2 и особенно в состоянии 3 (на 28% и 60% по сравнению с контролем соответственно, $p<0,05$ и $p<0,001$), что вдвое снижало ДК ($p<0,001$). Степень функциональной активности мт-КК, оцениваемая в Сг-тесте, снижалась у животных с диабетом в 1,6 раза по сравнению с контролем ($p<0,001$). Ежедневное введение метилина в течение 2 недель животным, получавшим СТЗ, не влияло на состояние 2, но увеличивало максимальное ADP-стимулированное состояние 3 и КДК в 1,7 раза ($p<0,01$). Функциональная связь мт-КК в группе ДМ увеличилась в 2,4 раза по сравнению с группой Д ($p<0,02$) и достоверно не отличалась от значения в контроле. Репрезентативные протоколы дыхания, демонстрирующие влияние метилина на состояние 3 и функциональную активность мт-КК, показаны на рисунке S4 (см. Дополнительные материалы).

Добавление 10 мкМ цитохрома *c* не влияло на ADP-стимулированное дыхание в диабетических группах Д и ДМ в конце эксперимента. Процентное отношение $V_{\text{сyt c}}/V_{\text{ADP}}$ составило $101,4\pm 2,8\%$, $98,0\pm 2,0\%$ и $100,2\pm 2,4\%$ в группах К, Д и ДМ соответственно, что свидетельствует об отсутствии повреждения наружной мембраны МХ под влиянием СТЗ и метилина.

Энергетическое состояние миокарда

После окончания эксперимента содержание АТР в миокарде достоверно не отличалось от исходного значения в контрольной группе и было незначительно снижено ($p=0,051$) у животных с диабетом (табл. 3). Короткое время развития диабета не оказало влияния на уровни ADP и AMP. Содержание этих адениннуклеотидов было близко к значениям в исходном состоянии и в контроле. В миокарде животных группы Д общий пул адениннуклеотидов ($\Sigma \text{AN} = \text{ATP} + \text{ADP} + \text{AMP}$) был достоверно снижен по сравнению с контролем ($p<0,05$). В сердцах диабетических животных было выявлено достоверное снижение содержания PCr (в среднем на 40% по сравнению с исходным состоянием и контролем, $p<0,02$ и $p<0,001$ соответственно) и отсутствие

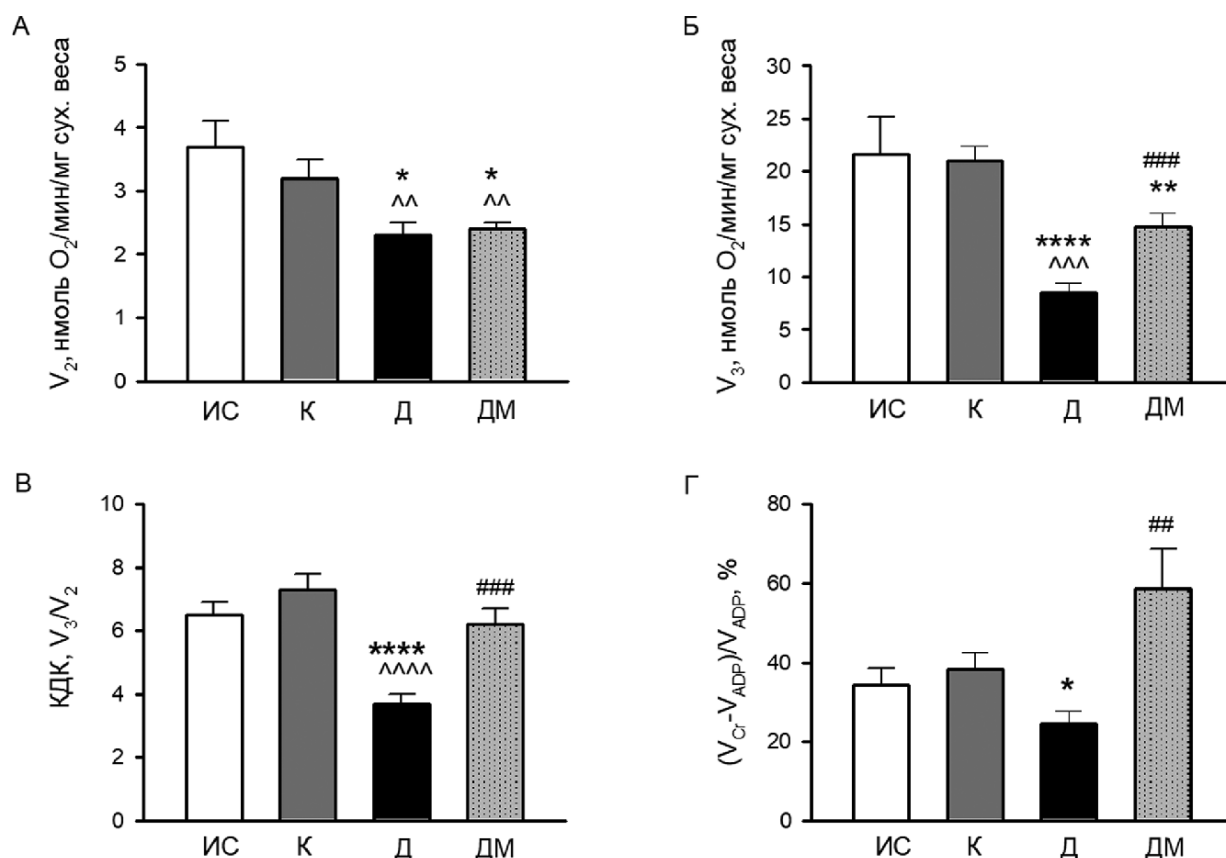


Рисунок 3. Параметры митохондриального дыхания в скинированных сапонином волокнах ЛЖ в присутствии 10 мМ глутамата и 5 мМ малаата. А – скорость потребления кислорода в состоянии 2 (V_2); Б – скорость потребления кислорода в состоянии 3 (V_3); В – коэффициент дыхательного контроля КДК = V_3/V_2 ; Г – степень связывания мт-КК с ОФ $(V_{Cr} - V_{ADP})/V_{ADP}$, %. Значения представляют $M \pm SEM$ для групп из 5 животных. ИС – исходное состояние; К – контроль; Д – крысы, получавшие СТЗ; ДМ – крысы, получавшие СТЗ и метилин. * – $p<0,05$ по сравнению с К; ** – $p<0,02$ по сравнению с К; **** – $p<0,001$ по сравнению с К; ^^ – $p<0,02$ по сравнению с ИС; ^^ – $p<0,01$ по сравнению с ИС; ^^^ – $p<0,001$ по сравнению с ИС; ## – $p<0,02$ по сравнению с Д; ### – $p<0,01$ по сравнению с Д.

ДЕЙСТВИЕ МЕТИЛИНА ПРИ СТРЕПТОЗОТОЦИНОВОМ ДИАБЕТЕ У КРЫС

Таблица 3. Параметры энергетического состояния сердца в изученных группах

	ИС	К	Д	ДМ
АТР	19,40±1,35	17,52±0,98	14,92±0,57	16,12±0,92
АДР	5,45±0,56	5,50±0,37	5,39±0,18	5,60±0,97
АМР	1,08±0,98	1,29±0,24	1,44±0,12	1,81±0,53
ΣАН	25,40±2,80	24,31±1,12	21,39±0,52*	23,63±0,75 [#]
РСг	26,89±3,61	25,09±0,30	14,96±0,66****^^	23,15±2,35 ^{##}
Сг	35,08±1,67	32,75±2,76	33,62±1,84	36,18±2,82
ΣСг	60,76±3,14	57,84±2,77	48,58±1,95*^	59,33±2,40 ^{###}
РСг/АТР	1,39±0,14	1,43±0,11	1,00±0,08***^	1,44±0,13 [#]

Примечание. ИС – исходное состояние; К – контроль; Д – крысы, получавшие СТЗ; ДМ – крысы, получавшие СТЗ и метилин. ΣАН=АТР+АДР+АМР; ΣСг=РСг+Сг. Значения представлены как М±SEM для групп из 5 животных. * – $p<0,05$ по сравнению с К; ** – $p<0,02$ по сравнению с К; **** – $p<0,001$ по сравнению с К; ^ – $p<0,05$ по сравнению с ИС; ^^ – $p<0,02$ по сравнению с ИС; # – $p<0,05$ по сравнению с Д; ## – $p<0,02$ по сравнению с Д; ### – $p<0,01$ по сравнению с Д.

изменения содержания Сг. В результате потеря ΣСг=РСг+Сг составила 22% и 16% по сравнению с исходным уровнем и контролем соответственно ($p<0,05$). Введение метилина не влияло на отдельные адениновые нуклеотиды или ΣАН, несмотря на тенденцию к увеличению АТР в миокарде в группе ДМ. В значительно большей степени метилин оказывал влияние на систему РСг-Сг. Совместное применение СТЗ с метилином увеличивало содержание РСг в группе ДМ в 1,5 раза по сравнению с группой Д к концу исследования ($p<0,02$). После введения метилина РСг сохранялся на преддиабетическом уровне, а содержание Сг незначительно повышалось по сравнению с контролем, что приводило к увеличению ΣСг в 1,3 раза по сравнению с группой Д ($p<0,01$) и отсутствию разницы с исходным состоянием. Таким образом, введение метилина полностью предотвращало потери ΣСг в миокарде животных с диабетом. Под влиянием СТЗ отношение РСг/АТР в сердце снижалось в среднем в 1,4 раза по сравнению с исходным состоянием и контролем ($p<0,05$ и $p<0,02$ соответственно). Введение метилина восстанавливало отношение РСг/АТР до нормального значения, которое достоверно отличалось от этого показателя в группе Д ($p<0,05$).

ОБСУЖДЕНИЕ

Энергетика миокарда и эффекты метилина у крыс с СД1

После воздействия СТЗ у крыс были выявлены гипергликемия, потеря прироста массы тела, повышение активности КК-МВ и ЛДГ в плазме и выраженные нарушения энергетики сердца: уменьшение содержания РСг и ΣКр и снижение отношения РСг/АТР в миокарде. Кроме того, выявлены существенные изменения дыхательных параметров волокон миокарда — двукратное уменьшение КДК у животных, получавших СТЗ, которое было обусловлено глубоким снижением максимального АДР-стимулированного потребления кислорода (состояние 3). Обычно такие изменения связывают с ограничением продукции АТР [16] и увеличением

образования активных форм кислорода (АФК) [17]. В дополнение у животных с диабетом по сравнению с контролем было обнаружено снижение функциональной активности мт-КК, оцененной в тесте с Сг, что является индикатором ухудшения биоэнергетики кардиомиоцитов [18].

В настоящей работе впервые показано защитное действие метилина на крысах, получавших СТЗ. Введение этого пептида вместе с СТЗ незначительно увеличивало прирост массы тела и снижало уровень экспериментальной гипергликемии к концу эксперимента. Метилин улучшал энергетику диабетического миокарда на тканевом и митохондриальном уровне. Так, в результате его влияния повышалось содержание РСг, предотвращалась потеря ΣКр и восстанавливалось сниженное отношение РСг/АТР в диабетическом сердце. Как правило, снижение отношения РСг/АТР обнаруживается в миокарде пациентов с диабетом 2 типа [19] и сердечной недостаточностью [20]. Считается, что такие изменения могут отражать нарушение функции МХ при кардиометаболических заболеваниях [21]. Прямая связь между отношением РСг/АТР и функцией МХ сердца не установлена. Однако такие факторы, как доступность Сг и РСг и активность мт-КК могут влиять на функцию МХ в кардиомиоцитах. Наши результаты показывают, что устранение потерь ΣСг под действием метилина сочеталось с увеличением функционального сопряжения мт-КК с окислительным фосфорилированием у животных, получавших СТЗ. Этому соответствовало увеличение дыхания МХ в АДР-стимулированном состоянии 3 и увеличение КДК. Введение метилина крысам с диабетом сохраняло целостность мембран кардиомиоцитов, что проявлялось в снижении активности КК-МВ и ЛДГ в плазме до исходных уровней. Повышенные уровни циркулирующих КК-МВ и ЛДГ были обнаружены на моделях ДКМП, вызванной введением СТЗ лабораторным животным, и у пациентов с диабетом. Они могут служить маркерами сердечно-сосудистого риска и повреждения миокарда [22, 23]. Этот эффект метилина отражает лучшее метаболическое состояние

сердца и, в частности, предотвращение потери ΣCr , что указывает на меньшее повреждение мембран кардиомиоцитов [24].

Возможные механизмы действия метилина при СД1

Результаты нашего исследования показывают, что ежедневное введение метилина снижает уровень глюкозы в крови. Они согласуются с более ранними сообщениями о том, что природные С-концевые фрагменты апелина проявляют глюкозоснижающее действие при диабете, вызванном СТЗ [25], увеличивая утилизацию глюкозы в различных тканях и в первую очередь в скелетных мышцах, жировой ткани и сердечной мышце [26]. Эти эффекты связаны со стимулируемым апелином фосфорилированием АМР-активируемой протеинкиназы (АМРК) и эндотелиальной NO-синтазы (eNOS) [26]. В некоторых исследованиях отмечается, что помимо снижения уровня глюкозы и увеличения её утилизации, пептиды апелина могут стимулировать выработку инсулина и снижать резистентность к инсулину [27]. В частности, введение экзогенного апелина-13 значительно улучшало массу островков поджелудочной железы и повышало уровень инсулина в сыворотке на моделях СД1 [28, 29].

Улучшение энергетики МХ сердца у крыс с диабетом, получавших метилин, могло быть связано со снижением образования АФК. В культивируемых кардиомиоцитах Н9с2 и взрослых кардиомиоцитах этот пептид ослаблял окислительный стресс, вызванный ИРП, за счёт снижения образования митохондриального супероксида и H_2O_2 [9]. С помощью метода ЭПР и спиновой ловушки 5,5-диметил-1-пирролин-N-оксид (ДМПО) мы показали, что метилин снижает образование аддуктов гидроксильных радикалов ДМПО-ОН при реперфузии сердца после периода ишемии [30]. Механизмы снижения продукции АФК метилином тесно связаны с активацией антиоксидантных ферментов. Это предположение хорошо подтверждается повышением активности Cu, Zn-SOD, CAT и GSH-Px в сердце и сопутствующим снижением образования малонового диальдегида, вторичного продукта перекисного окисления липидов, при ИРП миокарда под влиянием метилина [30]. Другой возможностью снижения продукции АФК является мобилизация реперфузионных киназ PI3K-Akt и MEK1/2-ERK1/2 [31], приводящая к ингибированию открытия поры перехода проницаемости митохондрий (mPTP) и защите от апоптоза. Происходящее при этом снижение высвобождения цитохрома c из межмембранного пространства может способствовать уменьшению образования митохондриального супероксида. В совокупности эти результаты ясно демонстрируют антиоксидантную активность метилина. В настоящее время накоплен обширный экспериментальный материал, подтверждающий участие АФК в энергетическом дефиците диабетического сердца, способствующего развитию ДКМП [32]. В связи с этим влияние метилина на источники АФК может стать полезным терапевтическим подходом для профилактики и лечения диабета.

Система метилин/APJ может влиять на энергетику миокарда при диабете за счёт изменений в биогенезе митохондрий. Было показано, что пептиды апелина увеличивают экспрессию коактиватора пероксисом (PGC1- α), активируемого пролифератором пероксисом (PGC1- α) — коактиватора транскрипции, регулирующего клеточный энергетический обмен, ядерных респираторных факторов 1 (NRF1) и 2 (NRF2), а также фактора А митохондриальной транскрипции (Tfam) в скелетных мышцах инсулинорезистентных мышей [33]. Эти эффекты сочетались с увеличением соотношения мтДНК/ядерная ДНК и плотности интрамиофибриллярных и субсарколеммальных митохондрий. Экспрессия комплексов II, III и V дыхательной цепи и активность цитратсинтазы — маркера содержания митохондрий — также увеличивалась у мышей, получавших апелин [34]. Таким образом, усиление биогенеза митохондрий метилином может способствовать улучшению дыхательной функции в скинированных волокнах сердца диабетических крыс в наших экспериментах. Следует отметить, что пептиды апелина усиливают экспрессию PGC1- α через АМРК путь в клетках сердца [35]. Именно за счёт этого механизма природные апелины и метилин могут регулировать индукцию антиоксидантной защиты, включая активность SOD, CAT и GSH-Px, а также повышать экспрессию сиртуина 3 — ключевого регулятора митохондриальной антиоксидантной системы. Это демонстрирует связь между биогенезом митохондрий и антиоксидантной способностью митохондрий, реализуемой пептидами апелина.

Другим важным аспектом действия метилина является уменьшение ИРП сердца. Ранее мы изучали сигнальные механизмы, участвующие в ограничении размеров острого инфаркта миокарда метилином на моделях ИРП сердца у крыс [31]. Было установлено, что защитное действие метилина связано с передачей сигналов через компоненты киназных каскадов PI3K и MEK1/2, сопровождающейся активацией нижестоящих мишеней — eNOS и митохондриальных K^+ АТР-каналов, а также Na^+/H^+ и $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ обменников сарколеммы. Недавние исследования показали, что апелин-12 ингибирует апоптоз и окислительный стресс при диабете через пути, в которых участвует PI3K и p38-МАРК, что приводит к уменьшению ИРП сердца [36]. В соответствии с этим введение апелина-12 устраняло потери мышечных волокон, некроз и уменьшало дисфункцию диабетического сердца. Кроме того, апелин-13 уменьшал экспрессию молекул адгезии, увеличивал пролиферацию и ангиогенез в результате активации пути APJ рецептор — ядерный фактор κB (NF- κB), что снижало эндотелиальную дисфункцию, вызванную диабетом [37]. Эти данные предполагают, что применение метилина у больных СД1 с ИРП миокарда может быть перспективным. Обсуждаемые эффекты метилина, наши предыдущие результаты и действие пептидов апелина на диабетическое сердце, показанное другими авторами, схематически представлены на рисунке 4.

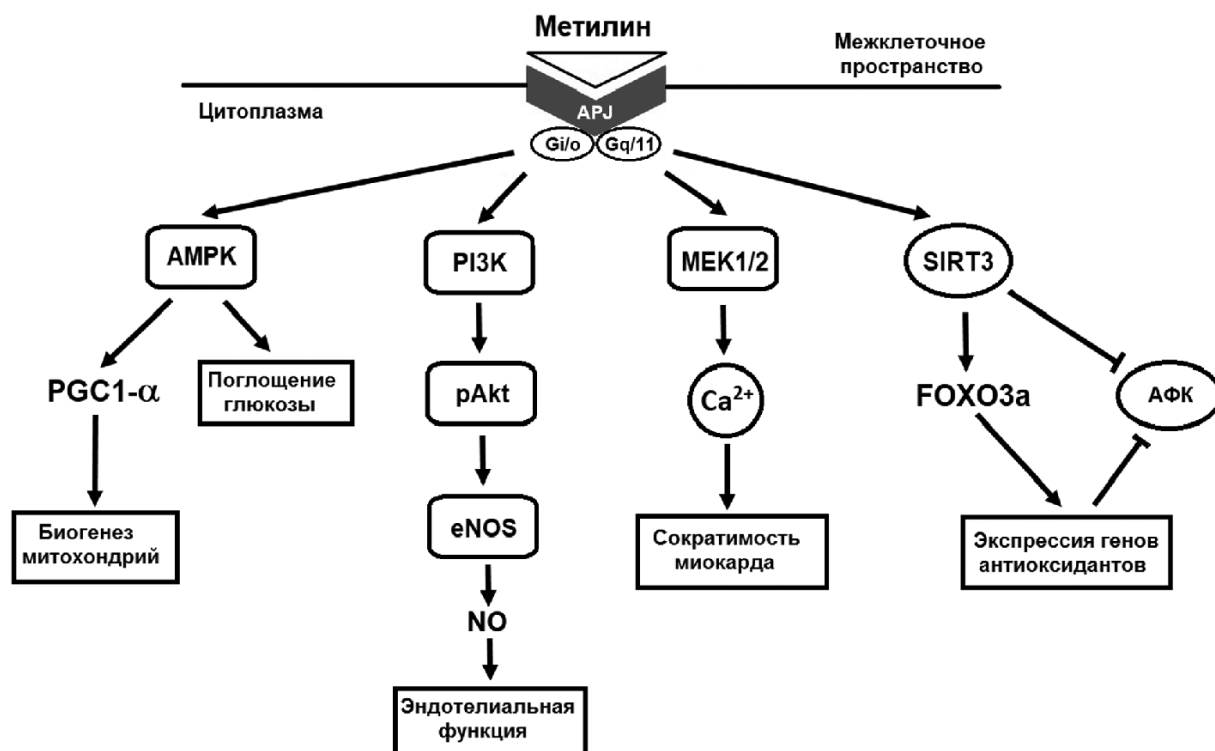


Рисунок 4. Активация метилином рецептора APJ запускает сигнальные каскады, которые оказывают защитное действие на диабетическое сердце. AMPK – AMP-активируемая протеинкиназа; PGC1-α – коактиватор гамма-рецептора, активируемого пролифератором пероксисом 1-α; PI3K – фосфоинозитид-3-киназа; pAkt – фосфорилированная протеинкиназа B; eNOS – эндотелиальная синтаза оксида азота; MEK1/2 – митоген-активируемые протеинкиназы киназы 1 и 2; SIRT3 – NAD-зависимая протеиндеацетилаза сиртуин-3; FOXO3a – член семейства факторов транскрипции forkhead (FoxO); АФК – активные формы кислорода.

ВЫВОДЫ

Результаты работы свидетельствуют о том, что введение крысам СТЗ вызывает нарушения энергетики сердца и в том числе дисфункцию МХ на ранних этапах развития диабета. Данное исследование демонстрирует также антидиабетический эффект метилина — структурного аналога апелина-12 — у крыс, получавших СТЗ. Введение метилина снижает уровень глюкозы в крови, благоприятно модулирует митохондриальную дисфункцию сердца, тем самым улучшая энергетическое состояние миокарда, и уменьшает повреждение мембран кардиомиоцитов. Мы полагаем, что использование протеолитических стабильных модифицированных пептидных агонистов рецептора APJ может быть перспективной фармакологической стратегией защиты сердца при СД1.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность д-ру А.А. Абрамову (НМИЦ кардиологии им. ак. Е.И. Чазова) за выделение сердец у наркотизированных животных.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ (гранты № 18-015-00008 и № 18-015-00009).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все этапы эксперимента соответствовали требованиям международных правил гуманного отношения к животным, отражённых в санитарных правилах по отбору животных и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Дополнительные материалы доступны в электронной версии статьи на сайте журнала (pbmc.ibmc.msk.ru).

ЛИТЕРАТУРА

1. Tao L.-C., Wang T.-T., Zheng L., Hua F., Li J.-J. (2022) The role of mitochondrial biogenesis dysfunction in diabetic cardiomyopathy. *Biomol. Ther.*, **30**(5), 399–408. DOI: 10.4062/biomolther.2021.192
2. Labieniec-Watala M., Siewiera K., Jozwiak Z. (2011) Resorcyldene aminoguanidine (RAG) improves cardiac mitochondrial bioenergetics impaired by hyperglycaemia in a model of experimental diabetes. *Int. J. Mol. Sci.*, **12**, 8013–8026. DOI: 10.3390/ijms12118013
3. Duncan J.G. (2011) Mitochondrial dysfunction in diabetic cardiomyopathy. *Biochim. Biophys. Acta*, **1813**(7), 1351–1359. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2011.01.014

4. Kinjo T., Higashi H., Uno K., Kuramoto N. (2021) Apelin/apelin receptor system: molecular characteristics, physiological roles, and prospects as a target for disease prevention and pharmacotherapy. *Curr. Mol. Pharmacol.*, **14**, 210–219. DOI: 10.2174/1874467213666200602133032
5. Hu G., Wang Z., Zhang R., Sun W., Chen X. (2021) The role of apelin/apelin receptor in energy metabolism and water homeostasis: A comprehensive narrative review. *Front. Physiol.*, **10**(12), 632886. DOI: 10.3389/fphys.2021.632886
6. Palmer E.S., Irwin N., O'Harte F.P.M. (2022) Potential therapeutic role for apelin and related peptides in diabetes: An update. *Clin. Med. Insights: Endocrinol. Diabetes*, **15**, 11795514221074679. DOI: 10.1177/11795514221074679
7. Ashley E.A., Powers J., Chen M., Kundu R., Finsterbach T., Caffarelli A., Deng A., Eichhorn J., Mahajan R., Agrawal R., Greve J., Robbins R., Patterson A.J., Bernstein D., Quertermous T. (2005) The endogenous peptide apelin potentially improves cardiac contractility and reduces cardiac loading *in vivo*. *Cardiovasc. Res.*, **65**(1), 73–82. DOI: 10.1016/j.cardiores.2004.08.018
8. Sidorova M.V., Az'muko A.A., Pal'keeva M.E., Molokoedov A.S., Bushuev V.N., Dvoriansev S.N., Shul'zhenko V.S., Pelogeykina Y.A., Pisarenko O.I., Bessalova Zh.D. (2012) Synthesis and cardioprotective properties of apelin-12 and its structural analogs. *Russ. J. Bioorg. Chem.*, **38**, 40–51. DOI: 10.1134/S1068162012010177
9. Pisarenko O., Shulzhenko V., Studneva I., Pelogeykina Y., Timoshin A., Anesia R., Valet P., Parini A., Kunduzova O. (2015) Structural apelin analogues: Mitochondrial ROS inhibition and cardiometabolic protection in myocardial ischaemia-reperfusion injury. *Br. J. Pharmacol.*, **172**, 2933–2945. DOI: 10.1111/bph.13038
10. Knorr R., Trzeciak A., Bannwarth W., Gillessen D. (1989) New coupling reagents in peptide chemistry. *Tetrahedron Lett.*, **30**, 1927–1930. DOI: 10.1016/S0040-4039(00)99616-3
11. Chen H., Brahmabhatt S., Gupta A., Sharma A.C. (2005) Duration of streptozotocin-induced diabetes differentially affects p38-mitogen-activated protein kinase (MAPK) phosphorylation in renal and vascular dysfunction. *Cardiovasc. Diabetol.*, **4**, 3. DOI: 10.1186/1475-2840-4-3
12. Saks V.A., Veksler V.I., Kuznetsov A.V., Kay L., Sikk P., Tiivel T., Tranqui L., Olivares J., Winkler K., Wiedemann F., Kunz W.S. (1998) Permeabilized cell and skinned fiber techniques in studies of mitochondrial function *in vivo*. *Mol. Cell. Biochem.*, **184**(1–2), 81–100. DOI: 10.1023/A:1006834912257
13. Kuznetsov A.V., Veksler V.I., Gellerich F.N., Saks V.A., Margreiter R., Kunz W.S. (2008) Analysis of mitochondrial function *in situ* in permeabilized muscle fibers, tissues and cells. *Nature Protocols*, **3**(6), 965–976. DOI: 10.1038/nprot.2008.61
14. Bergmeyer H.U. (1974) In: *Methods of Enzymatic Analysis*, 4th ed., New York, Academic Press, pp. 1196–1200, 1475–1478, 1772–1776, 1777–1781, 2101–2110.
15. Vanderlinde R.E. (1985) Measurement of total lactate dehydrogenase activity. *Ann. Clin. Lab. Sci.*, **15**, 13–31.
16. Avram V.F., Merce A.P., Hancu I.M., Bătrân A.D., Kennedy G., Rosca M.G., Muntean D.M. (2022) Impairment of mitochondrial respiration in metabolic diseases: An overview. *Int. J. Mol. Sci.*, **23**, 8852. DOI: 10.3390/ijms23168852
17. Dominiak K., Jarmuszkiewicz W. (2021) The relationship between mitochondrial reactive oxygen species production and mitochondrial energetics in rat tissues with different contents of reduced coenzyme Q. *Antioxidants*, **10**(4), 533. DOI: 10.3390/antiox10040533
18. Guzun R., Timohhina N., Tepp K., Monge C., Kaambre T., Sikk P., Kuznetsov A.V., Pison C., Saks V. (2009) Regulation of respiration controlled by mitochondrial creatine kinase in permeabilized cardiac cells *in situ*: Importance of system level properties. *Biochim. Biophys. Acta*, **1787**(9), 1089–1105. DOI: 10.1016/j.bbabi.2009.03.024
19. Bugger H., Abel E.D. (2010) Mitochondria in the diabetic heart. *Cardiovasc. Res.*, **88**(2), 229–240. DOI: 10.1093/cvr/cvq239
20. Neubauer S., Horn M., Cramer M., Harre K., Newell J.B., Peters W., Pabst T., Ertl G., Hahn D., Ingwall J.S., Kochsiek K. (1997) Myocardial phosphocreatine-to-ATP ratio is a predictor of mortality in patients with dilated cardiomyopathy. *Circulation*, **96**(7), 2190–2196. DOI: 10.1161/01.cir.96.7.2190
21. de Wit-Verheggen V.H.W., Schrauwen-Hinderling V.B., Brouwers K., Jörgensen J.A., Schaart G., Gemmink A., Nascimento E.B.M., Hesselink M.K.C., Wildberger J.E., Segers P., Montaigne D., Staels B., Schrauwen P., Lindeboom L., Hoeks J., van de Weijer T. (2023) PCr/ATP ratios and mitochondrial function in the heart. A comparative study in humans. *Sci. Rep.*, **13**, 8346. DOI: 10.1038/s41598-023-35041-7
22. Huang E.J., Kuo W.W., Chen Y.J., Chen T.H., Chang M.H., Lu M.C., Tzang B.S., Hsu H.H., Huang C.Y., Lee S.D. (2006) Homocysteine and other biochemical parameters in type 2 diabetes mellitus with different diabetic duration or diabetic retinopathy. *Clinica Chimica Acta*, **366**, 293–298. DOI: 10.1016/j.cca.2005.10.025
23. Fuleshwor M., Pratik A., Deepak K. (2013) Study of lipid profile and the effect of cardiac enzymes in type 2 diabetes mellitus patient developing coronary heart disease. *Int. Res. J. Pharm. Appl. Sci.*, **3**, 51–54.
24. Zervou S., Whittington H.J., Russell A.J., Lygate C.A. (2016) Augmentation of creatine in the heart. *Mini Rev. Med. Chem.*, **16**, 19–28. DOI: 10.1016/j.ajme.2017.05.006
25. Hegab I.I. (2018) Ameliorative effect of apelin on streptozotocin-induced diabetes and its associated cardiac hypertrophy. *Alexandria J. Med.*, **54**(2), 119–127. DOI: 10.1016/j.ajme.2017.05.006
26. Attané C., Daviaud D., Dray C., Dusaulcy R., Masseboeuf M., Prévot D., Carpené C., Castan-Laurell I., Valet P. (2011) Apelin stimulates glucose uptake but not lipolysis in human adipose tissue *ex vivo*. *J. Mol. Endocrinol.*, **46**, 21–28. DOI: 10.1677/JME-10-0105
27. Li C., Cheng H., Adhikari B.K., Wang S., Yang N., Liu W., Sun J., Wang Y. (2022) The role of apelin-APJ system in diabetes and obesity. *Front. Endocrinol.*, **13**, 820002. DOI: 10.3389/fendo.2022.820002
28. Gao Z., Zhong X., Tan Y.X., Liu D. (2021) Apelin13 alleviates diabetic nephropathy by enhancing nitric oxide production and suppressing kidney tissue fibrosis. *Int. J. Mol. Med.*, **48**(3), 175. DOI: 10.3892/ijmm.2021.5008
29. Chen H., Zheng C., Zhang X., Li J., Li J., Zheng L., Huang K. (2011) Apelin alleviates diabetes-associated endoplasmic reticulum stress in the pancreas of Akita mice. *Peptides*, **32**(8), 1634–1639. DOI: 10.1016/j.peptides.2011.06.025
30. Pisarenko O.I., Lankin V.Z., Kononova G.G., Serebryakova L.I., Shulzhenko V.S., Timoshin A.A., Tskitishvili O.V., Pelogeykina Y.A., Studneva I.M. (2014) Apelin-12 and its structural analog enhance antioxidant defense in experimental myocardial ischemia and reperfusion. *Mol. Cell. Biochem.*, **391**(1–2), 241–250. DOI: 10.1007/s11010-014-2008-4

31. Pisarenko O.I., Shulzhenko V.S., Studneva I.M., Serebryakova L.I., Pelogeykina Y.A., Veselova O.M. (2015) Signaling pathways of a structural analogue of apelin-12 involved in myocardial protection against ischemia/reperfusion injury. *Peptides*, **73**, 67–76. DOI: 10.1016/j.peptides.2015.09.001
32. Kaludercic N., di Lisa F. (2020) Mitochondrial ROS formation in the pathogenesis of diabetic cardiomyopathy. *Front. Cardiovasc. Med.*, **7**, 12. DOI: 10.3389/fcvm.2020.00012
33. Attané C., Foussal C., le Gonidec S., Benani A., Daviaud D., Wanecq E., Guzmán-Ruiz R., Dray C., Bezaire V., Rancoule C., Kuba K., Ruiz-Gayo M., Levade T., Penninger J., Burcelin R., Pénicaud L., Valet P., Castan-Laurell I. (2012) Apelin treatment increases complete fatty acid oxidation, mitochondrial oxidative capacity, and biogenesis in muscle of insulin-resistant mice. *Diabetes*, **61**, 310–320. DOI: 10.2337/db11-0100
34. Alfarano C., Foussal C., Lairez O., Calise D., Attané C., Anesia R., Daviaud D., Wanecq E., Parini A., Valet P., Kunduzova O. (2015) Transition from metabolic adaptation to maladaptation of the heart in obesity: Role of apelin. *Int. J. Obesity*, **39**, 312–320. DOI: 10.1038/ijo.2014.122
35. Than A., Zhang X., Leow M.K., Poh C.L., Chong S.K., Chen P. (2014) Apelin attenuates oxidative stress in human adipocytes. *J. Biol. Chem.*, **28**, 4763–4774. DOI: 10.1074/jbc.M113.526210
36. An S., Wang X., Shi H., Zhang X., Meng H., Li W., Chen D., Ge J. (2020) Apelin protects against ischemia-reperfusion injury in diabetic myocardium via inhibiting apoptosis and oxidative stress through PI3K and p38-MAPK signaling pathways. *Aging (Albany NY)*, **12**(24), 25120–25136. DOI: 10.18632/aging.104106
37. Li B., Yin J., Chang J., Zhang J., Wang Y., Huang H., Wang W., Zeng X. (2021) Apelin/APJ relieve diabetic cardiomyopathy by reducing microvascular dysfunction. *J. Endocrinol.*, **249**(1), 1–18. DOI: 10.1530/JOE-20-0398

Поступила в редакцию: 14. 03. 2024.
После доработки: 06. 05. 2024.
Принята к печати: 13. 05. 2024.

THE STRUCTURAL ANALOGUE OF APELIN-12 PREVENTS ENERGY DISORDERS IN THE HEART IN EXPERIMENTAL TYPE 1 DIABETES MELLITUS

*I.M. Studneva, O.M. Veselova, I.V. Dobrokhoto, L.I. Serebryakova, M.E. Palkeeva, D.V. Avdeev, A.S. Molokoedov, M.V. Sidorova, O.I. Pisarenko**

Chazov National Medical Research Center of Cardiology,
15a Academician Chazov str., Moscow, 121552 Russia; *e-mail: olpi@live.ru

Type 1 diabetes mellitus (T1DM) is the most severe form of diabetes, which is characterized by absolute insulin deficiency induced by the destruction of pancreatic beta cells. The aim of this study was to evaluate the effect of a structural analogue of apelin-12 ((N^oMe)Arg-Pro-Arg-Leu-Ser-His-Lys-Gly-Pro-Nle-Pro-Phe-OH, metilin) on hyperglycemia, mitochondrial (MCh) respiration in permeabilized cardiac left ventricular (LV) fibers, the myocardial energy state, and cardiomyocyte membranes damage in a model of streptozotocin (STZ) diabetes in rats. Metilin was prepared by solid-phase synthesis using the Fmoc strategy and purified using HPLC. Four groups of animals were used: initial state (IS); control (C), diabetic control (D) and diabetic animals additionally treated with metilin (DM). The following parameters have been studied: blood glucose, MCh respiration in LV fibers, the content of cardiac ATP, ADP, AMP, phosphocreatine (PCr) and creatine (Cr), the activity of creatine kinase-MB (CK-MB) and lactate dehydrogenase (LDH) in blood plasma. Administration of metilin to STZ-treated rats decreased blood glucose, increased state 3 oxygen consumption, the respiratory control ratio in MCh of permeabilized LV fibers, and increased the functional coupling of mitochondrial CK (mt-CK) to oxidative phosphorylation compared with these parameters in group D. In STZ-treated animals metilin administration caused an increase in the PCr content and prevention of the loss of total creatine ($\Sigma Cr = PCr + Cr$) in the diabetic hearts, as well as restoration of the PCr/ATP ratio in the myocardium and a decrease in the activity of CK-MB and LDH in plasma to initial values. Thus, metilin prevented energy disorders disturbances in cardiomyocytes of animals with experimental T1DM.

The whole English version is available at <http://pbmc.ibmc.msk.ru>.

Key words: apelin-12 analogue; streptozotocin diabetes; rat heart; mitochondrial dysfunction; myocardial energy state

Funding. The study was carried out with financial support from the Russian Foundation for Basic Research (project nos. 18-015-00008 and 18-015-00009).

Received: 14.03.2024; revised: 06.05.2024; accepted: 13.05.2024.