

УДК 613.632:615.36
© Коллектив авторов

РОЛЬ ИНГИБИРОВАНИЯ ОБРАЗОВАНИЯ NO В ВОССТАНОВЛЕНИИ МЕТАБОЛИЗМА ИШЕМИЗИРОВАННОГО СЕРДЦА КРЫСЫ АПЕЛИНОМ-12

О.И. Писаренко, Ю.А. Пелогейкина, В.С. Шульженко, И.М. Студнева,
Ж.Д. Беспалова, А.А. Азьмуко, М.В. Сидорова, М.Е. Палькеева*

ФГУ Российский кардиологический научно-производственный комплекс
Минздравсоцразвития России, 121552 Москва, 3-я Черепковская ул. 15А;
факс: (495)149-0559; эл. почта: olpi@cardio.ru

Изучено влияние 12-членного пептида апелина-12 (H-Arg-Pro-Arg-Leu-Ser-His-Lys-Gly-Pro-Met-Pro-Phe-OH A-12) на энергетический обмен и функцию изолированного сердца крысы, перфузируемого раствором Кребса (РК) с 11 мМ глюкозой, подвергнутого глобальной ишемии и реперфузии. Введение 140 мкМ A-12 перед ишемией увеличивало содержание АТР, общего фонда адениннуклеотидов ($\Sigma \text{АН} = \text{АТР} + \text{АДР} + \text{АМР}$) в сердце и энергетический потенциал кардиомиоцитов ($(\text{АТР} + 0,5\text{АДР})/\Sigma \text{АН}$) в конце реперфузии по сравнению с контролем (РК), снижало содержание лактата и отношение лактат/пироват в реперфузированном миокарде до исходных значений. Это сопровождалось улучшением восстановления функции сердца и коронарных сосудов. В присутствии 100 мкМ L-NAME (ингибитора NO-синтазы) влияние A-12 на метаболическое и функциональное восстановление реперфузированного миокарда значительно снижалось. Результаты указывают на участие NO в механизмах защитного действия A-12, которые тесно связаны с восстановлением энергетического состояния ишемизированного миокарда.

Ключевые слова: апелин-12, ишемия и реперфузия сердца, энергетический обмен, NO, L-NAME.

ВВЕДЕНИЕ. Разработка средств, снижающих повреждение миокарда, вызванные ишемией и реперфузией, является актуальной задачей современной экспериментальной кардиологии. Нарушения в энергетическом обмене ишемизированного миокарда, диктуют необходимость использования соединений, способных восстанавливать окислительное фосфорилирование в кардиомиоцитах во время реперфузии [1]. В последние годы показано, что экспрессия адипоцитокина апелина и его APJ рецептора в эндотелиальных клетках и кардиомиоцитах участвует в регуляции тонуса коронарных сосудов и сократимости миокарда [2]. В условиях недостаточного снабжения сердца энергетическими субстратами и кислородом активация системы апелин-APJ рецептор С-концевыми фрагментами пептида (апелином-13 и в меньшей степени апелином-36) способна улучшать восстановление функции сердца после ишемии, блокировать открытие митохондриальной поры и апоптоз [3, 4]. Полагают, что эти пептиды могут действовать через компоненты сигнальных каскадов, включающие PI3-Akt киназы и MAP-киназы, мишенями которых являются эндотелиальная NO-синтаза (eNOS), рибосомальная p70S6-киназа и проапоптозный белок BAD/BAX [5-7]. В условиях *in vivo* из апелина-13 под действием глутаминилциклазы образуется пироглутаматный апелин-13 ([Pyr¹]апелин-13), обладающий сходными свойствами [8, 9]. С-концевые фрагменты, содержащие

* - адресат для переписки

менее 10 остатков аминокислот, физиологически не эффективны [10, 11]. Исходя из этого, мы предположили, что фрагмент природного пептида апелин-12 (A-12) может быть ответственным за взаимодействие с APJ рецептором и проявление физиологических свойств. Для проверки этого предположения нами был синтезирован апелин-12, полностью идентичный С-концевому фрагменту апелина у животных различных видов и человека. На моделях изолированного перфузируемого сердца крысы и сердца крыс *in situ*, было обнаружено, что его введение улучшает восстановление функции и метаболизма сердца при реперфузии и ограничивает размеры инфаркта [12, 13].

Снижение гибели кардиомиоцитов и закрытие митохондриальной поры под действием апелина-13 и -12 [3, 4, 13] предполагает их влияние на энергетический обмен ишемизированного миокарда, одним из ключевых механизмов которого может быть увеличение экспрессии eNOS [4, 14]. Однако данные по влиянию апелина-13 на экспрессию eNOS и образование NO в ишемическом миокарде малочисленны и противоречивы [3, 4]. Практически не изученным остается действие апелина-12 на метаболизм ишемизированного сердца. В связи с этим целью настоящей работы было выяснить влияние экзогенного апелина-12 на энергетическое состояние миокарда, реперфузированного после ишемии, а также оценить влияние ингибирования образования NO на функциональное и метаболическое действие пептида. Для исключения эффектов, обусловленных активностью аминопептидаз плазмы и нейрогуморальным влиянием, опыты были выполнены на изолированном сердце крыс, перфузируемом модифицированным буфером Кребса-Хензелейта.

МЕТОДИКА.

Получение H-Arg-Pro-Arg-Leu-Ser-His-Lys-Gly-Pro-Met-Pro-Phe-OH (A-12). A-12 был получен путем автоматического твердофазного синтеза на пептидном синтезаторе фирмы Applied Biosystems 431A (Германия) с использованием Fmoc-методологии на полимере Ванга по стандартным программам. Твердофазный синтез проводили, исходя из 0,25 ммоль коммерческого Fmoc-Phe-полимера ("Bachem", Швейцария), путем последовательного удлинения пептидной цепи с С-конца. На первой стадии синтеза с целью предотвращения побочной реакции образования дикетопиперазина из пролинсодержащего дипептидилполимера присоединяли дипептидный блок Fmoc-Met-Pro-OH. Далее цепь наращивали по одной аминокислоте. Для создания амидной связи применяли карбодиимидный метод. Конечный продукт отщепляли от полимерного носителя одновременно с удалением защитных групп боковых функций аминокислот действием трифторуксусной кислоты со скавенджерами. Пептид был очищен высокоэффективной жидкостной хроматографией (ВЭЖХ) до 98%-ной чистоты и охарактеризован с помощью ¹H-ЯМР-спектроскопии и MALDI-масс-спектрометрии (*m/z* 1423,5; расчетная молекулярная масса -1422,7). В работе использованы производные аминокислот, реагенты и растворители фирм "Bachem" и "Fluka" (Швейцария).

Перфузия изолированного сердца крысы. Опыты выполнены на сердце крыс-самцов линии Wistar (290-340 г). У наркотизированных уретаном (внутрибрюшинно 1,25 мг на г массы тела) животных извлекали сердце и перфузировали ретроградно в течение 15-20 мин раствором Кребса (РК) с 11 mM глюкозой, насыщенным карбогеном (95% O₂ ± 5% CO₂) pH 7,4±0,1 при 37°C, при постоянном перфузионном давлении 60 мм рт.ст. После этого сердца перфузировали антеградно по Нийли при постоянном давлении наполнения левого предсердия 15 мм рт. ст. и среднем перфузионном давлении в аорте 60 мм рт. ст. [12].

Давление в аорте и левом желудочке регистрировали при помощи тензометрических датчиков Р 50, монитора SP 1405 и регистратора SP 2010 ("Gould Statham", США). Показателем интенсивности сократительной функции (ИСФ) левого желудочка служило произведение частоты сокращений сердца на развиваемое давление (разность между систолическим и минимальным

диастолическим давлением). Насосную функцию левого желудочка оценивали по величине минутного (МО – сумме коронарного потока и аортального объёма) и ударного (отношению минутного объёма к частоте сокращений сердца) объёмов. Коронарное сопротивление рассчитывали из отношения аортального давления к коронарному потоку.

Протокол эксперимента. После перфузии сердца по Нийли в течение 20 мин регистрировали показатели функции сердца и коронарных сосудов (исходное состояние). Далее произвольным образом сердца включали в одну из трёх групп. В контроле осуществляли 5-минутную инфузию РК с постоянной скоростью 4 мл/мин и далее подвергали сердца глобальной нормотермической (37°C) ишемии в течение 35 мин. За ишемией следовала 5-минутная ретроградная инфузия РК со скоростью 4 мл/мин и реперфузия по Нийли в течение 25 мин. В группе A-12 растворённый в РК A-12 до концентрации 140 мкМ вводили в сердце путём инфузии со скоростью 4 мл/мин в течение 5 мин до ишемии. В группе A-12 + L-NAME 5-мин инфузию перед ишемией проводили РК, содержащим 140 мкМ A-12 и 100 мкМ L-NAME. Остальные стадии были выполнены без изменений, также как в контроле. В конце реперфузии или перед ишемией (исходное состояние) сердца замораживали охлажденными в жидком азоте щипцами Волленбергера для последующего определения метаболитов. В отдельной серии было изучено влияние введения 100 мкМ L-NAME в РК перед ишемией на восстановление функции сердца при реперфузии. При выборе концентрации A-12 нами были приняты во внимание результаты работы [12], в которой было показано, что концентрация 140 мкМ A-12 является оптимальной для восстановления функции сердца при использовании данной модели ишемии и реперфузии сердца.

Метаболическое состояние сердца. Замороженную ткань гомогенизировали в холодной 6% HClO_4 (10 мл на г ткани) в гомогенизаторе Ultra-Turrax T-25 (“IKA-Labortechnik”, Германия). Белки осаждали центрифугированием при 3000 g и 4°C в течение 10 минут. Супернатанты нейтрализовали 5 М K_2CO_3 до pH 7,4. Осадок KClO_4 отделяли центрифугированием в тех же условиях. Безбелковые экстракты хранили при -20°C до определения метаболитов. Сухой вес гомогенизированной ткани определяли после высушивания образцов в течение суток при 110°C. АТФ и фосфокреатин (ФКр) в тканевых экстрактах определяли спектрофотометрически, используя глюкозо-6-фосфатдегидрогеназу, гексокиназу и креатинкиназу [15]. Содержание ADP и АМРФ в тканевых экстрактах определяли с помощью миокиназы, пируваткиназы и лактатдегидрогеназы [16]. Для определения креатина (Кр) использовали сопряжённые реакции с креатинкиназой, пируваткиназой и лактатдегидрогеназой [17]. Лактат и пируват определяли с помощью лактатдегидрогеназы [18, 19]. Содержание метаболитов выражали в мкмоль/г сухого веса.

Приведённые показатели выражены как средняя \pm ошибка средней. Различия между группами оценивали с помощью t-критерия Стьюдента и считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.

Восстановление функции сердца и коронарных сосудов при реперфузии. В исходном состоянии (до моделирования глобальной ишемии и реперфузии) коронарный поток перфузируемого сердца составил 18 ± 2 мл/мин, коронарное сопротивление $3,64 \pm 0,05$ мм рт.ст./мл, развиваемое левым желудочком давление 99 ± 1 мм рт. ст., частота сокращений сердца 303 ± 2 уд./мин, ИСФ 31380 ± 560 мм рт.ст./мин, аортальный объём 26 ± 3 мл/мин, минутный объём 44 ± 1 мл. Влияние ишемии и реперфузии, а также введения A-12 и L-NAME перед ишемией на восстановление основных показателей функции сердца и коронарных сосудов к окончанию реперфузии суммировано на рисунке. В сердцах контрольной группы глобальная ишемия и последующая реперфузия приводили к существенно более низкому восстановлению коронарного потока, ИСФ и МО по сравнению с исходным состоянием; коронарное сопротивление

РОЛЬ АПЕЛИНА-12 В ВОССТАНОВЛЕНИИ МЕТАБОЛИЗМА СЕРДЦА КРЫСЫ

возрастало до $121 \pm 2\%$ от исходного значения ($p < 0,001$). После инфузии 100 мкМ L-NAME восстановление этих показателей достоверно не отличалось от значений в контроле. Введение A-12 перед ишемией возобновляло коронарный поток и снижало коронарное сопротивление практически до исходных значений (91 ± 5 и $108 \pm 6\%$, соответственно). Такой ответ коронарной системы косвенно указывал на увеличение образования NO в сердце под действием пептида. Одновременно под влиянием A-12 достоверно увеличивалось восстановление ИСФ и МО (в 1,8 и 2,9 раза по сравнению с контролем). Совместное введение A-12 и L-NAME ухудшало функциональное восстановление сердец по сравнению с действием одного пептида. В этом случае наблюдали достоверное уменьшение восстановления ИСФ и МО (в среднем на 20%), тенденцию к снижению коронарного потока и увеличению коронарного сопротивления. При этом показатели сократительной и насосной функции сердца (ИСФ и МО) оставались достоверно выше значений в контроле. Коронарный поток и коронарное сопротивление в группе A-12 + L-NAME составляли 84 ± 4 и $114 \pm 4\%$ от исходных значений и достоверно не отличались от значений в контроле (74 ± 3 и $125 \pm 4\%$, соответственно). Полученные наглядно демонстрируют снижение защитного действия A-12 на функцию коронарных сосудов и сердца крысы после ишемии при ингибировании образования NO в реакциях, катализируемых NO синтазами.

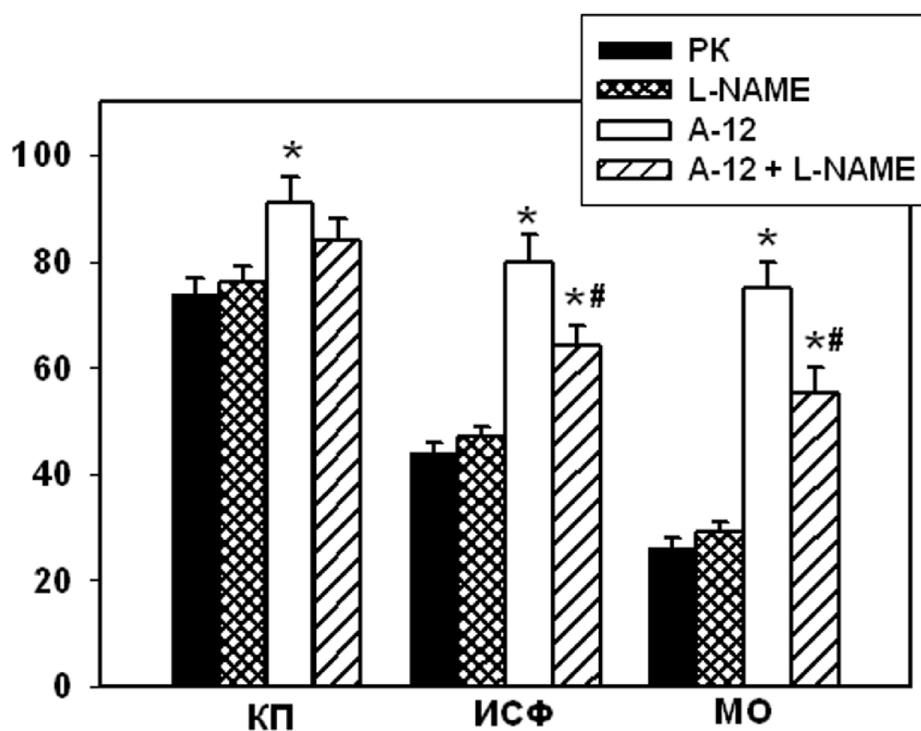


Рисунок.

Влияние пептида A-12 и L-NAME на восстановление коронарного потока (КП), интенсивности сократительной функции (ИСФ) и минутного объема (МО) изолированного сердца крысы к 30-й минуте реперфузии. Приведены средние \pm ошибка средней для серий из 6-8 опытов. Достоверно отличается ($p < 0,05$) от: контроля (PK) - *; A-12 - #. Контроль - перфузия сердец в течение всего опыта раствором Кребса (PK) без добавок; L-NAME - 5-мин перфузия сердец до ишемии PK, содержащим 100 мкМ L-NAME, в течение остальных стадий опыта сердца перфузировали PK; A-12 - 5-мин перфузия сердец до ишемии PK, содержащим 140 мкМ A-12, в течение остальных стадий опыта сердца перфузировали PK; A-12 + L-NAME - 5-мин перфузия сердец до ишемии PK, содержащим 100 мкМ L-NAME и 140 мкМ A-12, в течение остальных стадий опыта сердца перфузировали PK. Восстановление показателей в конце реперфузии выражено в % по отношению к исходному состоянию (20 мин перфузии сердец по Нийли до ишемии).

Энергетическое состояние реперфузированного миокарда. Изменения в содержании адениннуклеотидов в конце реперфузии в группах сопоставлены с исходными уровнями этих метаболитов в сердце в таблице 1. В контроле под действием ишемии и последующей реперфузии происходило снижение содержания АТФ до $35 \pm 4\%$ от исходного с одновременным увеличением содержания АДП и АМР в среднем в 2 и 5 раз, соответственно. Эти изменения указывали на преимущественный распад адениннуклеотидов, общий фонд которых (Σ АН) был снижен почти на 40% от предишемического значения. Под действием А-12 содержание АТФ к концу реперфузии достоверно увеличивалось в 1,6 раза при 2-кратном снижении уровня АМР. В результате фонд Σ АН в группе А-12 был сохранен значительно лучше, чем в контроле и составлял $81 \pm 6\%$ от исходного значения ($p < 0,05$). Перераспределение в содержании адениннуклеотидов достоверно увеличивало энергетический потенциал кардиомиоцитов и отношение АТФ/АДП в реперфузированных сердцах группы А-12 по сравнению с контролем. Введение А-12 совместно с L-NAME, снижая уровень АТФ, достоверно уменьшало содержание Σ АН в реперфузированном сердце до значения в контроле. Этому соответствовало снижение энергетического потенциала и отношения АТФ/АДП по сравнению с этими показателями в группе А-12, хотя они оставались выше, чем в контроле.

Таблица 1. Влияние инфузии апелина-12 и L-NAME перед ишемией на содержание адениннуклеотидов (в мкмоль/г сух. веса) в сердце крысы в конце реперфузии.

Метаболит	Исходное состояние	Конец реперфузии		
		РК	А-12	А-12 + L-NAME
АТФ	$22,42 \pm 2,06$	$7,75 \pm 0,88^a$	$13,11 \pm 0,69^{ab}$	$9,24 \pm 2,87^a$
АДП	$2,80 \pm 0,12$	$4,86 \pm 0,28^a$	$5,90 \pm 0,28^a$	$5,22 \pm 0,86^a$
АМР	$0,71 \pm 0,01$	$3,63 \pm 0,51^a$	$1,92 \pm 0,06^{ab}$	$1,99 \pm 0,38^{ab}$
ΣАН	$25,93 \pm 1,45$	$16,33 \pm 0,90^a$	$20,94 \pm 0,92^{ab}$	$16,45 \pm 1,34^a$
АТФ/АДП	$8,00 \pm 0,10$	$1,60 \pm 0,24^a$	$2,23 \pm 0,07^a$	$1,77 \pm 0,09^a$
Энергетический потенциал	$0,91 \pm 0,02$	$0,58 \pm 0,04^a$	$0,77 \pm 0,01^{ab}$	$0,72 \pm 0,03^{ab}$

Примечание. Достоверно отличается ($p < 0,05$) от: исходного состояния - а; РК - б; А-12 - в. Энергетический потенциал кардиомиоцитов рассчитывали как $(\text{АТФ} + 0,5\text{АДФ})/\Sigma\text{АН}$.

В сердцах контрольной группы в результате ишемического и реперфузионного повреждения содержание ФКр было снижено вдвое по сравнению с исходным значением (табл. 2). Инфузия А-12 не приводила к достоверному увеличению восстановления ФКр. Совместное введение А-12 и L-NAME не оказывало статистически достоверного влияния на содержание ФКр к концу реперфузии – в этом случае была отмечена лишь тенденция к снижению его уровня по сравнению с группой А-12. В сердцах всех групп обнаружено повышенное содержание креатина (в среднем на 30% по сравнению с исходным), эта величина была близка снижению содержания ФКр. В результате содержание общего креатина (Σ Кр) в группах в конце реперфузии достоверно не отличалось от исходного.

РОЛЬ АПЕЛИНА-12 В ВОССТАНОВЛЕНИИ МЕТАБОЛИЗМА СЕРДЦА КРЫСЫ

Таблица 2. Влияние инфузии апелина-12 и L-NAME перед ишемией на содержание фосфокреатина (ФКр) и креатина (в мкмоль/г сух. веса) в сердце крысы в конце реперфузии.

Метаболит	Исходное состояние	Конец реперфузии		
		Контроль	A-12	A-12 + L-NAME
ФКр	24,30±2,30	12,14±2,80^а	14,77±1,41^а	11,30±2,73^а
Креатин	34,96±2,13	44,51±2,70^а	44,88±2,14^а	45,91±4,22^а
ΣКр	59,26±1,87	56,65±2,34	59,65±1,56	57,21±2,84

Примечание. Достоверно отличается (p<0,05) от: исходного состояния - а; РК - б ; A-12 - в. ΣКр = ФКр + креатин.

Лучшее сохранение АТР и ΣАН в реперфузированном миокарде под действием A-12 предполагало изменения в утилизации глюкозы – единственного энергетического субстрата, использующегося при перфузии сердец. Влияние A-12 и L-NAME на конечные продукты анаэробного гликолиза – пирувата и лактата – сопоставлено с их исходным содержанием в интактном сердце и сердце, подвергнутом ишемии и реперфузии (табл. 3). В контроле содержание лактата и пирувата в миокарде было увеличено в 5 раз по сравнению с исходным значением, что свидетельствовало об анаэробном характере утилизации глюкозы при реперфузии. В противоположность контролю, в группе A-12 накопления лактата в сердце к концу реперфузии обнаружено не было – его содержание не отличалось от исходного. При совместном введении A-12 и L-NAME уровень лактата в реперфузированных сердцах превышал исходный в 3 раза. Соответственно, отношение лактат/пируват, отражающее окислительно-восстановительное состояние цитоплазматической пары NAD⁺/NADH, почти в 5 раз превышало исходное значение в контроле, снижалось до исходного уровня в группе под влиянием A-12 и увеличивалось в 1,6 раза при совместном введении A-12 и L-NAME.

Таблица 3. Влияние инфузии апелина-12 и L-NAME перед ишемией на содержание конечных продуктов гликолиза (в мкмоль/г сух. веса) в сердце крысы в конце реперфузии.

Метаболит	Исходное состояние	Конец реперфузии		
		Контроль	A-12	A-12 + L-NAME
Лактат	1,72±0,19	10,48±3,08^а	2,12±0,48^б	5,13±1,74
Пируват	0,18±0,02	0,23±0,03	0,22±0,02	0,34±0,07^а
Лактат/пируват	9,55±0,98	45,56±7,34^а	9,64±1,25^б	15,10±1,03^{аб}

Примечание. Достоверно отличается (p<0,05) от: исходного состояния - а; РК - б ; A-12 - в.

Из полученных данных следует, что введение A-12 улучшало энергетическое состояние ишемизированных сердец главным образом за счёт обеспечения более высокого уровня АТР. Следствием этого было увеличение содержания ΣАН

в миокарде и сохранение более высокого энергетического потенциала кардиомиоцитов в конце реперфузии по сравнению с этими показателями в контроле (табл. 1). Вероятно, эти изменения в энергетическом обмене были связаны с восстановлением окисления глюкозы. В присутствии L-NAME влияние А-12 на метаболизм реперфузированного миокарда значительно снижалось, указывая на важную роль NO в энергетическом обеспечении постишемических кардиомиоцитов.

Роль NO в механизмах действия апелина. Включение образования NO в физиологические механизмы действия А-12 было продемонстрировано у лабораторных животных различных видов и у человека. Показано, что гипотензивное действие пептида вызвано активацией системы апелин/APJ рецептор в эндотелиальных клетках и образованием NO, вызывающего релаксацию гладкомышечных клеток артериальной стенки. У наркотизированных крыс гипотензивный эффект А-12 (в большей степени, чем апелина-13 и апелина-36) сопровождался увеличением общего содержания в плазме нитритов и нитратов и отменялся в присутствии ингибитора NOS метилового эфира N^G-нитро-L-аргинина (L-NAME) [20]. Впоследствии дозо-зависимый характер снижения среднего артериального давления при инфузии А-12 был подтвержден на бодрствующих крысах [21]. Стимуляция APJ рецептора апелином увеличивала экспрессию фосфорилированных p70S6K и eNOS в результате активации сигнальных путей, включающих Akt и ERK1/2 киназы [5]. В опытах на мышах с нокаутированными генами апелина и APJ рецептора была обнаружена обратная взаимосвязь между системой апелин/APJ рецептор и Ang II-AT1 сигнальным каскадом, противоположным образом влияющими на артериальное давление [22, 23]. У здоровых добровольцев внутривенное введение [Pyr¹]апелин-13 и апелин-36 вызывало NO-зависимую артериальную вазодилатацию, и не влияло на тонус венозных сосудов [25].

При различной экспериментальной патологии также отмечены полезные эффекты апелина, связанные с образованием NO. Так, снижение эндотелиальной дисфункции аорты у диабетических мышей под действием апелина-13 было вызвано активацией сигнального пути PI3K-Akt-eNOS и сопровождалось фосфорилированием Akt по остаткам Ser-473 и фосфорилированием eNOS по остаткам Ser-1177 [24]. Вазодилатационный эффект апелина отменялся в присутствии L-NAME и ингибитора PI3K LY294002, что предполагало вклад фосфорилирования eNOS, инициируемого апелином, в улучшение функции эндотелия при диабете. На модели атеросклероза у мышей с нокаутированным геном аполипопротеина E [Pyr¹]апелин-13 уменьшал образование аневризмы аорты и снижал повреждающее действие ангиотензина II, благодаря уменьшению генерации активных форм кислорода [26]. Ключевая роль образования NO в эффектах пептида была подтверждена методом ЭПР с помощью диэтилдитиокарбамата железа (спиновой ловушки NO) и отменой защитного действия пептида в присутствии L-NAME.

Участие NO в кардиопротекторных эффектах апелина не столь очевидно. Zeng и соавт. показали, что снижение ишемического и реперфузионного повреждения, моделированного в изолированном перфузируемом сердце крысы и культуре неонатальных кардиомиоцитов, под действием апелина-13 сопровождалось увеличением экспрессии eNOS одновременно с увеличением фосфорилирование Akt и ERK1/2 [4]. Антиоксидантные свойства апелина-13 были подтверждены снижением генерации активных форм кислорода и уменьшением содержания малонового диальдегида – конечного продукта перекисного окисления липидов [4, 27]. Авторы не исключают, что эти эффекты были обусловлены не только экспрессией eNOS, но и увеличением активности супероксиддисмутазы под влиянием апелина-13, которая снижалась в ткани сердца и кардиомиоцитах под влиянием ишемии и реперфузии [4]. В тоже время, несмотря на активацию каскадов с участием PI3-Akt и ERK1/2 киназ под действием апелина-13

в изолированном сердце мыши, подвергнутом региональной ишемии и реперфузии, увеличения фосфорилирования eNOS обнаружено не было [3]. Указанные несоответствия во влиянии апелина-13 на eNOS могут быть связаны не только с различными моделями ишемии и реперфузии сердца, видовыми отличиями лабораторных животных, способами и дозами введенного пептида, но и с существованием других, независимых от продукции NO, механизмов защиты. К ним могут быть отнесены p38 и JNK киназы и JAK-STAT сигнальный путь, которые также вовлечены в снижение необратимого повреждения кардиомиоцитов [7, 28]. Имеются экспериментальные подтверждения того факта, что инотропные и эндотелий-зависимые вазодилатационные свойства [Pyr¹]апелина-13, апелина-13 и -36, опосредованы активацией циклооксигеназы и образованием простагличина и не зависят от ингибирования NOS [29,30].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ. Результаты настоящей работы демонстрируют улучшение энергетического обмена и функции сердца крысы при реперфузии в результате инфузии А-12 перед ишемией. Впервые показано одновременное снижение метаболического и функционального влияния А-12 в присутствии неспецифического ингибитора NOS L-NAME. Это предполагает участие NO в механизмах защитного действия А-12, которые тесно связаны с восстановлением энергетического состояния реперфузированного миокарда. Дальнейшее изучение кардиотропных свойств апелина с помощью спиновых ловушек активных форм кислорода и NO, а также селективных ингибиторов компонентов киназных каскадов и изоформ NOS представляется практически значимым для разработки подходов к защите миокарда с помощью фармакологических лигандов APJ рецептора.

Данная работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 08-04-00156а).

ЛИТЕРАТУРА

1. Verma S., Fedak P.W.M., Eeisel R.D. (2002) *Circulation*, **105**, 2332-2336.
2. Kleinz M.J., Davenport A.P. (2005) *Pharmacol. Ther.*, **107**, 198-211.
3. Simpkin J.C., Yellon D.M., Davidson S.M., Lim S.Y., Wynne A.M., Smith C.C. (2007) *Basic Res. Cardiol.*, **102**, 518-528.
4. Zeng X.J., Zhang L.K., Wang H.X., Lu L.Q., Ma L.Q., Tang Ch.S. (2009) *Peptides*, **30**, 1144-1152.
5. Masri B., Knibiehler B., Audigier Y. (2005) *Cell. Signal.*, **17**, 415-426.
6. Smith C.C., Mocanu M.M., Bowen J., Wynne A.M., Simpkin J.C., Dixon R.A. et al. (2007) *Cardiovasc. Drugs Ther.*, **21**, 409-414.
7. Kleinz M.J., Baxter G.F. (2008) *Regul. Pept.*, **146**, 271-277.
8. Berry M.F., Pirolli T.J., Jayasankar V., Burdick J., Morine K.J., Gardner T.J. et al. (2004) *Circulation*, **110**, II187-II193.
9. Szokodi I., Tavi P., Foldes G., Voutilainen-Myllyla S., Ilves M., Tokola H. et al. (2002) *Circ. Res.*, **91**, 434-440.
10. Hosoya M., Kawamata Y., Fukusumi S., Fujii R., Habata Y., Hinuma S. et al. (2002) *J. Biol. Chem.*, **275**(28), 21061-21067.
11. Lee D.K., Saldivia V.R., Nguyen T., Cheng R., George S.R., O'Dowd B.F. (2005) *Endocrinology*, **146**(1), 231-236.
12. Писаренко О.И., Шульженко В.С., Пелогейкина Ю.А., Студнева И.М., Кхатри Д.Н., Беспалова Ж.Д., Азьмуко А.А., Сидорова М.В., Палькеева М.Е. (2010) *Кардиология*, **50**(10), 44-49.
13. Писаренко О.И., Серебрякова Л.И., Пелогейкина Ю.А., Студнева И.М., Кхатри Д.Н., Цкитишвили О.В., Беспалова Ж.Д., Азьмуко А.А., Сидорова М.В., Палькеева М.Е. (2011) *Бюлл. эксперим. биол. мед.*, **152**(7), 86-89.

14. Shultz R., Kelm M., Heusch G. (2004) *Cardiovasc. Res.*, **61**, 402–413.
15. Lamprecht W., Stein P., Heinz F., Weissner H. (1974) in: *Methods of enzymatic analysis* (Bergmeyer H.U., ed.) Academic Press, N.-Y., pp. 1777–1781.
16. Jaworek D., Gruber W., Bergmeyer H.U. (1974) in: *Methods of enzymatic analysis* (Bergmeyer H.U., ed.) Academic Press, N.-Y., pp. 2127–2131.
17. Bernt E., Bergmeyer H.U., Mollering H. (1974) in: *Methods of enzymatic analysis* (Bergmeyer H.U., ed.) Academic Press, N.-Y., pp. 1772–1776.
18. Gutman I., Wahlenfeld A.W.L. (1974) in: *Methods of enzymatic analysis* (Bergmeyer H.U., ed.) Academic Press, N.-Y., pp. 1464–1467.
19. Czok R., Lamprecht W. (1974) in: *Methods of enzymatic analysis* (Bergmeyer H.U., ed.) Academic Press, N.-Y., pp. 1446–1448.
20. Tatemoto K., Takayama K., Zou M.X., Kumaki I., Zhang W., Kumano K. et al. (2001) *Regul. Pept.*, **99**, 87–92.
21. Cheng X., Cheng X.S., Pang C.C. (2003) *Eur. J. Pharmacol.*, **470**, 171–175.
22. Ishida J., Hashimoto T., Hashimoto Y., Nishiwaki S., Iguchi T., Harada S., Sugaya T., Matsuzaki H., Yamamoto R., Shiota N., Okunishi H., Kihara M., Umemura S., Sugiyama F., Yagami K., Kasuya Y., Mochizuki N., Fukamizu A. (2004) *J. Biol. Chem.*, **279**, 26274–26279.
23. Kasai A., Shintani N., Kato H., Matsuda S., Gomi F., Haba R., Hashimoto H., Kakuda M., Tano Y., Baba A. (2008) *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **28**, 1717–1722.
24. Japp A.G., Cruden N.L., Amer D.A., Li V.K.Y., Goudie E.B., Johnston N.R., Sharma S., Neilson I., Webb D.J., Megson I.L., Flapan A.D., Newby D.E. (2008) *J. Am. Coll. Cardiol.*, **52**, 908–913.
25. Zhong, J.C. et al. (2007) *Cardiovasc. Res.*, **74**, 388–395.
26. Chun H.J., Ali Z.A., Kojima Y., Kundu R.K., Sheikh A.Y., Agrawal R., Zheng L., Leeper N.J., Pearl N.E., Patterson A.J., Anderson J.P., Tsao Ph.S., Lenardo M.J., Ashley E.A., Quertermous T. (2008) *J. Clin. Invest.*, **118**, 3343–3354.
27. Jia Y.X., Lu Z.F., Zhang J., Pan C.S., Yang J.H., Zhao J., et al. (2007) *Peptides*, **28**, 2023–2029.
28. Hausenloy D.J., Yellon D.M. (2004) *Cardiovas. Res.*, **61**, 448–460.
29. Maguire J.J., Kleinz M.J., Pitkin S.L., Davenport A.P. (2009) *Hypertension*, **54**, 598–604.
30. Jaszberenyi M., Bujdoso E., Telegdy G. (2004) *Neuroscience*, **129**, 811–816.

Поступила: 17. 02. 2011.

THE INFLUENCE OF INHIBITING NO FORMATION ON METABOLIC RECOVERY
OF ISCHEMIC RAT HEART BY APELIN-12

*O.I. Pisarenko, Yu.A. Pelogeykina, V.S. Shulzhenko, I.M. Studneva, Z.D. Beshpalova,
A.A. Az'muko, M.V. Sidorova, M.E. Pal'keeva*

Russian Cardiology Research-and-Production Complex, 3-ya Cherepkovskaya ul., 15A,
Moscow, 121552 Russia; fax: (495)149-0559; e-mail: olpi@cardio.ru

Apelin 12 (A-12) was synthesized by the automatic solid phase method with use of Fmoc ¹H-NMR spectroscopy and mass spectrometry. Effects of apelin-12 (a peptide comprised of 12 aminoacids, A-12) on recovery of energy metabolism and cardiac function were studied in isolated working rat hearts perfused with Krebs buffer (KB) containing 11 mM glucose that were subjected to global ischemia and reperfusion. A short-term infusion of μ M 140 A-12 in KB prior to ischemia enhanced myocardial ATP, the total adenine nucleotide pool (Σ AN=ATP+ADP+AMP) and the energy charge of cardiomyocytes ((ATP+0.5ADP)/ Σ AN) at the end of reperfusion compared with control (KB infusion) and reduced lactate content and lactate/pyruvate ratio in reperfused myocardium to the initial values. This effect was accompanied by improved recovery of coronary flow and cardiac function. Coadministration of 140 μ M A-12 and 100 μ M L-NAME (the nonspecific NOS inhibitor) profoundly attenuated the peptide influence on metabolic and functional recovery of reperfused hearts. The results indicate involvement of NO, formed under the peptide action, in mechanisms of cardioprotection that are tightly associated with recovery of energy metabolism in postischemic heart.

Key words: apelin-12, myocardial ischemia and reperfusion, energy metabolism, NO, L-NAME.