

©Коллектив авторов

## ЗАЩИТНОЕ ДЕЙСТВИЕ МОДИФИЦИРОВАННОГО ФРАГМЕНТА ГАЛАНИНА ПРИ СЕРДЕЧНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ У КРЫС, ВЫЗВАННОЙ ДОКСОРУБИЦИНОМ

*И.М. Студнева, М.Е. Палькеева, О.М. Веселова, А.С. Молокоедов, Р.О. Любимов,  
М.В. Овчинников, М.В. Сидорова, О.И. Писаренко\**

Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии,  
121552, Москва, 3-я Черепковская ул., 15а; \*эл. почта: olpi@live.ru

Применение противоопухолевого препарата доксорубицин (Докс) ограничено из-за его кардиотоксического действия. Методом автоматического твердофазного синтеза пептидов получен синтетический агонист рецепторов галанина GalR1-3 [βAla14, His15]-галанин (2-15) (G), обладающий кардиопротекторными свойствами. Его очистка выполнена методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ); гомогенность и структура пептида подтверждены с помощью ВЭЖХ, <sup>1</sup>H-ЯМР-спектроскопии и масс-спектрометрии. Целью настоящего исследования было изучение влияния G на метаболизм и функцию сердца крыс с хронической сердечной недостаточностью, вызванной Докс. Опыты проведены на самцах крыс Вистар весом 280-300 г. Контрольной группе животных (К) 8 недель внутрибрюшинно вводили физиологический раствор; доксорубициновой группе (Д) – внутрибрюшинно Докс; группе Докс+пептид G (Д+G) – внутрибрюшинно Докс и подкожно пептид G; группе пептид G (G) – подкожно G. В начале и в конце исследования в плазме крови определяли концентрацию продуктов, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой (ТБКАП), и активность креатинкиназы-МВ (КК-МВ), вес животных и оценивали функцию сердца с помощью эхокардиографии. По окончании опытов сердца использовали для определения содержания метаболитов и оценки окислительного фосфорилирования в митохондриях. После 8-недельного исследования группа Д характеризовалась выраженной сердечной недостаточностью, отсутствием увеличения веса, увеличением концентрации ТБКАП и активности КК-МВ в плазме. Эти нарушения сопровождались снижением содержания макроэргических фосфатов в сердце, уменьшением дыхательного контроля митохондрий, накоплением в сердце лактата и глюкозы, изменениями в обмене глутаминовой, аспарагиновой кислот и аланина. Совместное введение G и Докс предотвращало увеличение активности КК-МВ и значительно снижало концентрацию ТБКАП в плазме. В конце экспериментов в группе Д+G энергетическое состояние миокарда животных и дыхательный контроль митохондрий были выше, чем в группе Д, отмечено снижение анаэробного гликолиза и отсутствие изменений в содержании аминокислот по сравнению с контролем. Пептид G значительно улучшал функцию сердца и вызвал увеличение веса у животных группы Д+G по сравнению с этими показателями в группе Д. Полученные результаты свидетельствуют о способности пептида G ослаблять кардиотоксические эффекты Докс.

**Ключевые слова:** доксорубицин; кардиотоксичность; галанин; сердечная недостаточность; метаболизм миокарда

**DOI:** 10.18097/PBMC20196501051

### ВВЕДЕНИЕ

Препарат антрациклинового ряда доксорубицин (Докс) является одним из самых эффективных и широко применяемых химиотерапевтических средств. Однако клиническое применение Докс ограничено кардиотоксическим действием, которое может привести к кардиомиопатии и хронической сердечной недостаточности (ХСН) [1]. Механизмы повреждающего действия Докс связаны главным образом с ингибированием синтеза нуклеиновых кислот путём интеркаляции между парами азотистых оснований, нарушением вторичной спирализации ДНК за счёт взаимодействия с топоизомеразой II, а также связыванием с липидами клеточных мембран, которое приводит к изменению транспорта ионов [2]. В результате метаболизма препарата образуются цитотоксичные активные формы кислорода (АФК), активирующие перекисное окисление липидов и нарушающие образование энергии в митохондриях [3]. Докс вызывает подавление экспрессии ряда генов в кардиомиоцитах, в результате чего нарушается синтез внутриклеточных белков [4]. Эти процессы

инициируют запуск различных механизмов гибели эндотелиальных клеток и кардиомиоцитов – некроз, аутофагию и апоптоз. Подходы, заключающиеся в оптимизации режимов введения Докс, применении его липосомальных форм и использовании Докс с антиоксидантами не устраняют высокую кардиотоксичность этого препарата [1, 4]. В связи с этим разработка лекарственных средств, предотвращающих или ослабляющих повреждение сердца, вызванные Докс, является актуальной задачей. Экзогенные N-концевые фрагменты галанина, связываясь с рецептором GalR2, оказывают защитное действие на кардиомиоциты при моделировании ишемического и реперфузионного (И/Р) повреждения. Оно обусловлено снижением образования супероксидных радикалов в митохондриях и запуском сигнальных каскадов, приводящих к уменьшению гибели клеток от апоптоза и некроза [5, 6]. Результатом этого является улучшение энергетического состояния и функции поврежденного сердца [7]. Из исследованных нами пептидных агонистов рецепторов галанина наибольшей противоишемической эффективностью в моделях *in vivo* обладает химерный

\* - адресат для переписки

лиганд WTLNSAGYLLGPβАН (G) [6]. Влияние этого соединения не было изучено ранее при ХСН, вызванной введением Докс.

Цель данной работы заключалась в выяснении действия пептида G на метаболизм и функцию сердца крыс при хроническом повреждении миокарда Докс. Для этого исследовали показатели энергетического обмена и содержание в сердце ключевых аминокислот – глутаминовой, аспарагиновой кислот и аланина, – глюкозы и лактата, а также дыхание митохондрий в скинированных сапонином волокнах миокарда. Кардиотоксическое действие Докс характеризовали активностью МВ-фракции креатинкиназы (КК-МВ) в крови, снижением фракции выброса (ФВ) и фракции укорочения (ФУ) сердца и уровнем окислительного стресса у животных.

## МЕТОДИКА

Для синтеза пептида G были использованы производные L-аминокислот и реагенты фирм “Fluka” и “NovaBiochem” (Швейцария). Аналитическую ВЭЖХ проводили на приборе Knauer (ФРГ); колонка Kromasil 100-5C18 4,6×250 мм, 5 мкм; пептиды элюировали со скоростью 1 мл/мин градиентом буфера Б в буфере А: от 10% до 70% за 30 мин, буфер А – 0,05 М КН<sub>2</sub>РO<sub>4</sub>, рН 3,0, буфер Б – 70% ацетонитрила в буфере А, детекция при λ=220 нм. Препаративную ВЭЖХ проводили на приборе “Knauer” с колонкой Eurosphere ODS (20×250 мм), размер частиц сорбента 10 мкм. В качестве элюентов использовали буфер А – 0,1% трифторуксусная кислота, буфер Б – 80% ацетонитрил в буфере А. Элюцию проводили градиентом 0,5% в минуту буфера Б в буфере А от 100% буфера А со скоростью 10 мл/мин, детекция при λ=220 нм. Фракции, соответствующие целевому веществу, объединяли, концентрировали в вакууме и лиофилизировали.

<sup>1</sup>H-ЯМР-спектры регистрировали на спектрометре WH-500 Bruker 500 МГц (ФРГ) в DMSO-d<sub>6</sub> при 300 К, концентрация пептида составляла 3 мг/мл, химические сдвиги измеряли относительно тетраметилсилана. Масс-спектры регистрировали на приборе Ultraflex MALDI TOF/TOF (“Bruker Daltonics”, ФРГ) с использованием метода матрично-активированной лазерной десорбции/ионизации.

Автоматический твердофазный синтез пептида G проводили с использованием Fmoc-методологии на синтезаторе Tribute-UV (“Protein Technologies Inc.”, США), начиная с 0,53 г (0,375 ммоль) Fmoc-His(Trt)-полимера (“Nova Biochem”) со степенью замещения стартовой аминокислотой – 0,71 ммоль/г. Пептидную цепь наращивали ступенчато с использованием

4-кратных избытков Fmoc-производных аминокислот в присутствии N,N,N',N'-тетраметил-О-(бензотриазол-1-ил)уруния тетрафторбората и N-метилморфолина по стандартной программе. Заключительное деблокирование и отщепление пептида от полимерного носителя проводили в одну стадию действием трифторуксусной кислоты. Пептид очищали с помощью препаративной ВЭЖХ в вышеприведённых условиях. Характеристики пептида G приведены в таблице 1.

Исследование кардиопротекторных свойств пептида G проведено на 48 крысах-самцах линии Вистар весом 280-300 г. Животные были распределены на 4 группы по 12 крыс в каждой: (1) Контрольная группа (К) – внутрибрюшинное введение крысам физиологического раствора (1 мл/кг веса еженедельно в течение 8 недель); (2) Докс (Д) – внутрибрюшинное введение животным Докс (2 мг/кг веса еженедельно в течение 4 недель) и физиологического раствора (1 мл/кг веса еженедельно в течение 4 последующих недель); (3) Докс+пептид G (Д+G) – внутрибрюшинное введение животным Докс (2 мг/кг веса еженедельно в течение 4 недель), физиологического раствора (1 мл/кг веса еженедельно в течение 4 последующих недель) и подкожное введение пептида G (50 нмоль/кг веса ежедневно в течение 8 недель); (4) пептид G (G) – подкожное введение G (50 нмоль/кг веса ежедневно в течение 8 недель).

Перед началом исследования (исходное состояние) животных взвешивали, в плазме крови была определена активность КК-МВ и содержание продуктов, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой (ТБК-активные продукты, ТБКАП), показатели функции сердца были оценены методом эхокардиографии (ЭхоКГ). В конце 8-недельного эксперимента у наркотизированных животных каждой группы (уретан, 120 мг/кг) были извлечены сердца для определения метаболитов и оценки окислительного фосфорилирования в скинированных волокнах левого желудочка (ЛЖ).

В безбелковых (6% НСlO<sub>4</sub>, 10 мл/г ткани) нейтрализованных 5 М К<sub>2</sub>СО<sub>3</sub> до рН 7,4 экстрактах сердец содержание адениннуклеотидов (АТФ, АДФ и АМР), фосфокреатина (ФКр), креатина (Кр), глюкозы, лактата, глутаминовой (Глу), аспарагиновой (Асп) кислот и аланина (Ала) определяли энзиматическими методами с помощью спектрофотометра Shimadzu UV-1800 (Япония) [8]. Дыхание митохондрий в скинированных сапонином волокнах ЛЖ оценивали по методу [9], используя полярограф Оxygraph plus system (“Hansatech Instr.”, Великобритания). Субстратами дыхания служили 10 мМ Глу и 5 мМ малат. Активность КК-МВ в плазме

Таблица 1. Физико-химические характеристики пептида G

Последовательность пептида G (Брутто-формула)	M <sub>расчет</sub>	Выход*, %	Растворимость в воде, мг/мл	ВЭЖХ		Данные MALDI, m/z
				%	R <sub>t</sub> , мин	
H-Trp-Thr-Leu-Asn-Ser-Ala-Gly- Tyr-Leu-Leu-Gly-Pro-βAla-His-OH (C <sub>70</sub> H <sub>102</sub> N <sub>18</sub> O <sub>19</sub> )	1499,67	46,3	>20	98,2	14,2	1499,76; 1521,73 [M+Na] <sup>+</sup> 1537,72 [M+K] <sup>+</sup>

Примечание: \* – приведён выход в расчёте на стартовую аминокислоту, присоединённую к полимеру.

определяли наборами BioSystems S.A. (Испания); концентрацию ТБКАП – с помощью набора Cayman's TBARS Kit ("Cayman Chemical Company", США). Трансторакальная ЭхоКГ выполнена на аппарате фирмы VUJIFILM Visual Sonic модель Vevo 1100 (Нидерланды) с линейным датчиком 13-24 МГц и максимальной глубиной лоцирования 30 мм. В В-режиме измеряли диастолические и систолические размеры ЛЖ, из них рассчитывали ФВ и ФУ.

Результаты исследования выражены в виде средней величины  $\pm$  ошибка средней. Различия между группами оценивали с помощью t-критерия Стьюдента и считали статистически значимыми при  $p < 0,05$ . Использован пакет программ SigmaPlot 12 version 12 ("Systat Software Inc.", США).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Пептид G представляет собой химерную молекулу, содержащую фрагмент агониста рецептора галанина GalR2, – последовательность (2-11) и карнозина (дипептида Н-βAla-His-OH). Известно, что карнозин обладает антиоксидантными свойствами и способен снижать повреждения сердца, возникающие при ишемии и реперфузии [10]. Включение в молекулу пептида G остатка βAla увеличивает его протеолитическую стабильность; кроме того, наличие полярного остатка гистидина на два порядка увеличивает растворимость пептида G в воде по сравнению с природным фрагментом галанина (2-11) (20 мг/мл и 0,2 мг/мл, соответственно).

У животных контрольной группы спустя 8 недель наблюдения отмечено увеличение средней массы тела (табл. 2). При ЭхоКГ исследовании у животных этой группы не обнаружено изменений в частоте сокращений сердца (ЧСС) и показателях сократимости и ремоделирования ЛЖ (КДР, КСР, ФУ, ФВ) по сравнению с исходным состоянием. У животных, получавших Докс, после 8 недель отмечено отсутствие прироста массы тела по сравнению с группой контроля. Оно было связано с дистрофией внутренних органов вследствие развития ХСН, а также с системным токсическим действием Докс. Под влиянием Докс наблюдалось снижение сократимости миокарда. Оно проявлялось в достоверном увеличении КДР и КСР по сравнению с исходными значениями, что свидетельствовало о дилатации левого желудочка (ЛЖ) сердца.

Одновременно наблюдали достоверное уменьшение ФУ и ФВ по сравнению со значениями в исходном состоянии и у контрольной группы. Совместное введение Докс и пептида G сопровождалось увеличением массы тела животных, а также достоверно снижало КСР и увеличивало ФУ и ФВ по сравнению с этими показателями в группе Д. Введение в течение 8 недель пептида G не приводило к изменению массы тела животных по сравнению с контролем. У животных группы G не было отмечено изменений ЧСС, диастолического и систолического размера ЛЖ и сократимости сердца.

Кардиотоксичность у животных, получавших Докс, сопровождалась не только нарушением функции сердца, но и увеличением активности в плазме КК-МВ. После 8 недель исследования активность этого маркера некроза миокарда в группе Д была почти в 3 раза выше, чем в контроле (рис. 1А). Введение пептида G одновременно с Докс (группа Д+G) снижало этот показатель до значения в контроле. Под действием пептида G изменений в активности КК-МВ в плазме крови не происходило – в группе G к окончанию исследования этот показатель не отличался достоверно от значений в контроле и в исходном состоянии, но был ниже, чем у животных группы Д+G. Введение Докс инициировало окислительный стресс у животных. После 8 недель исследования содержание ТБКАП в плазме крови крыс, получавших Докс, было в 6,6 раза выше, чем у животных контрольной группы (рис. 1Б). Введение пептида G животным, получавшим Докс, снижало этот показатель в 2,6 раза, хотя содержание ТБКАП в группе Д+G оставалось более высоким, чем в контроле и в исходном состоянии. У крыс, получавших пептид G в течение 8 недель, концентрация ТБКАП в плазме крови не отличалась от значений в исходном состоянии и в контроле, но была достоверно ниже, чем у животных группы Д+G.

Одним из основных механизмов развития кардиотоксичности под действием антрациклинов является повреждение митохондрий, приводящее к нарушению энергетического обмена в клетке [2-4]. После 8 недель исследования у крыс группы Д общий пул адениннуклеотидов (ΣАН) был снижен по сравнению с этим показателем в контрольной группе за счёт достоверно более низкого содержания АТР (табл. 3). Содержание ФКр и ΣКр в группе Д было снижено на 50% и 25%, соответственно, по сравнению

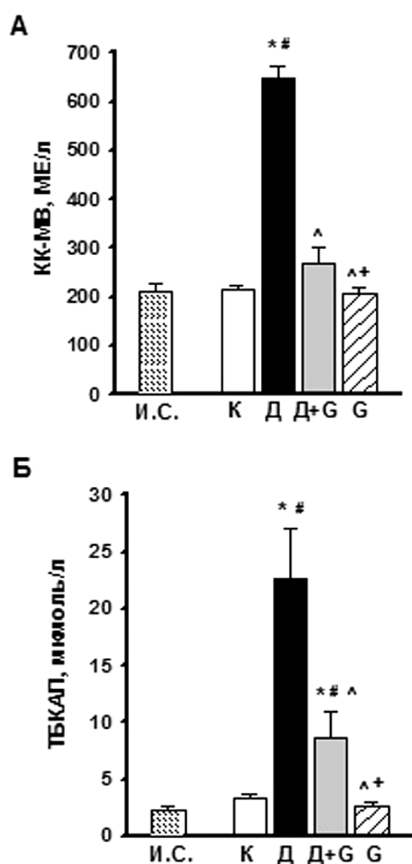
Таблица 2. Влияние Докс и пептида G на массу животных, показатели ЭхоКГ и ЧСС в экспериментальных группах

Показатель	Исходное состояние (n=48)	8 недель			
		К (n=12)	Д (n=12)	Д+G (n=12)	G (n=12)
Масса, г	338±5	425±12*	354±6 <sup>#</sup>	398±5* <sup>#^</sup>	423±6* <sup>^+</sup>
КДР, мм	6,4±0,1	6,6±0,2	7,2±0,1* <sup>#</sup>	7,0±0,1*	6,6±0,2 <sup>^</sup>
КСР, мм	3,3±0,1	3,9±0,3	4,9±0,1* <sup>#</sup>	4,2±0,1* <sup>^</sup>	3,3±0,2 <sup>^+</sup>
ЧСС, уд./мин	450±8	432±19	440±4	434±8	445±10
ФУ, %	46,9±0,6	46,7±1,4	31,3±1,0* <sup>#</sup>	40,5±1,0* <sup>#^</sup>	48,3±0,6 <sup>^+</sup>
ФВ, %	79,8±1,3	76,1±2,6	53,2±1,7* <sup>#</sup>	68,8±1,7* <sup>#^</sup>	81,8±1,0 <sup>^+</sup>

Примечание. КСР и КДР – конечно систолический и конечно диастолический размер ЛЖ. ФУ=(КСР-КСР)/КСР·100%. ФВ=(КСР-КСР)/КСР·100%, где КСР и КСО конечные диастолический и систолический объёмы. Достоверно отличается ( $p < 0,05$ ) от: \* – исходного состояния, # – К, ^ – Д, + – Д+G.

с контролем. В результате отношение ФКр/АТР, характеризующее энергообеспечение сердца, было вдвое ниже, чем в контроле. Взаимосвязь между показателями биоэнергетики сердца и классами ХСН по NYHA предполагает, что низкое отношение ФКр/АТР в миокарде человека может быть предиктором смертности от сердечно-сосудистых заболеваний [11]. Функциональное состояние

митохондрий сердца оценивали по величине дыхательного контроля (ДК) в скинированных волокнах ЛЖ. У крыс группы Д величина ДК была в 1,7 раза ниже ( $p=0,105$ ), чем у животных контрольной группы, что указывало на тенденцию к разобщению окисления и фосфорилирования вследствие повреждения митохондрий Докс. Введение животным пептида G совместно с Докс существенно улучшало энергетическое состояние сердца. Так, к окончанию 8-й недели в группе Д+G отмечена тенденция к увеличению содержания АТР в сердце до величины в контроле, что приводило к достоверному возрастанию  $\Sigma$ АН по сравнению с этим показателем в группе Д. У животных группы Д+G содержание ФКр в миокарде было недостоверно более высоким, чем в группе Д ( $p=0,256$ ) и достоверно не отличалось от значения в контроле. Содержание  $\Sigma$ Кр в сердце было достоверно выше, чем у животных группы Д и достоверно не отличалось от этого показателя в контроле. Поскольку снижение внутриклеточного фонда  $\Sigma$ Кр в сердце связывают с повреждениями сарколеммы [12], более высокое содержание Кр в группе Д+G указывало на снижение повреждения клеточных мембран под действием пептида G. В группе Д+G отношение ФКр/АТР было на 26% выше, чем в группе Д, однако это различие не было статистически значимым. Поддержка пептидом G более высокого энергетического состояния сердца крыс, получавших Докс, сочеталась с улучшением функционального состояния комплексов дыхательной цепи митохондрий. ДК в группе Д+G был достоверно выше, чем в группе Д и достоверно не отличался от значения в контроле. У животных, получавших пептид G в течение 8 недель, величины энергетических показателей сердца не отличались от таковых в контрольной группе, а содержание ФКр,  $\Sigma$ Кр и отношение ФКр/АТР было достоверно более высоким, чем в группе Д.



**Рисунок 1.** Влияние пептида G на активность КК-МВ и концентрацию ТБКАП в плазме крови крыс, получавших Докс. (А) Активность КК-МВ (МЕ/л плазмы) в плазме в исходном состоянии и в исследуемых группах после 8 недель. Достоверно отличается ( $p<0,05$ ) от: \* – исходного состояния (И.С.), # – контроля (К), ^ – группы Д, + – группы Д+G. (Б) Концентрация ТБКАП (ммоль/л плазмы) в плазме в исходном состоянии и в исследуемых группах после 8 недель. Достоверно отличается ( $p<0,05$ ) от: \* – исходного состояния (И.С.), # – контроля (К), ^ – группы Д, + – группы Д+G.

Мы изучили действие Докс и пептида G на содержание в сердце глюкозы и лактата, а также ключевых аминокислот миокарда – аланина, глутаминовой и аспарагиновой кислот – менее изученных мишеней токсичного воздействия антрациклинов. ХСН, индуцированная Докс, сопровождается снижением  $\beta$ -окисления жирных кислот, увеличением захвата глюкозы миокардом и компенсаторным усилением анаэробного гликолиза для поддержания продукции АТР [3, 13, 14].

**Таблица 3.** Влияние Докс и пептида G на энергетические показатели сердца крысы

Показатель	8 недель			
	К (n=12)	Д (n=12)	Д+G (n=12)	G (n=12)
АТР	13,73 $\pm$ 0,83	10,87 $\pm$ 0,90*	15,01 $\pm$ 1,63	14,49 $\pm$ 1,81
$\Sigma$ АН	21,03 $\pm$ 1,00	17,80 $\pm$ 1,80	24,63 $\pm$ 2,12#	22,77 $\pm$ 2,55
ФКр	27,40 $\pm$ 1,33	13,10 $\pm$ 3,80*	19,08 $\pm$ 3,44	23,05 $\pm$ 2,05#
$\Sigma$ Кр	67,67 $\pm$ 1,00	50,24 $\pm$ 3,92*	69,32 $\pm$ 3,26#	68,54 $\pm$ 3,16#
ФКр/АТР	2,01 $\pm$ 0,12	1,01 $\pm$ 0,30*	1,27 $\pm$ 0,21*	1,89 $\pm$ 0,18#
ДК	6,45 $\pm$ 1,45	3,85 $\pm$ 0,14	5,54 $\pm$ 0,70#	5,97 $\pm$ 1,02

Примечание. Данные выражены в ммоль/г сух. веса для метаболитов. Коэффициент дыхательного контроля (ДК) рассчитан как отношение  $V_3/V_4$  для 6 опытов, где  $V_3$  – скорость дыхания на 10 мМ Глу и 5 мМ Мал в присутствии 2 мМ ADP,  $V_4$  – скорость дыхания на этих субстратах без ADP. Достоверно отличается ( $p<0,05$ ) от: \* – К, # – Д.

В соответствии с этим у крыс группы Д после 8-недельного эксперимента содержание глюкозы и лактата в сердце было, соответственно, в 2,5 и 4,3 раза выше, чем у животных контрольной группы. Введение пептида G совместно с Докс снижало содержание глюкозы до значения в контроле и одновременно в 1,7 раза уменьшало содержание лактата по сравнению с этим показателем в группе Д. При введении только пептида G в течение 8 недель уровень глюкозы в сердце достоверно не отличался от значения в контрольной группе, а содержание лактата было незначительно выше, чем в контроле.

Известно, что содержание глутаминовой, аспарагиновой кислот и аланина в сердце млекопитающих значительно выше остальных аминокислот. Эти аминокислоты через окисление соответствующих им кетокислот ( $\alpha$ -кетоглутарата, оксалоацетата и пирувата) в цикле трикарбоновых кислот участвуют в обеспечении сердца энергией [15]. Обмен глутаминовой и аспарагиновой кислоты связан с функционированием малат-аспартатного челнока, транспортирующего восстановительные эквиваленты цитоплазматического NADH в митохондрию [16], и таким образом, с утилизацией глюкозы. При нарушении аэробного энергообеспечения сердца скорость катаболизма глутаминовой и аспарагиновой кислот и образование аланина увеличиваются. Эти реакции промежуточного обмена сопряжены с усилением субстратного фосфорилирования в митохондриях на уровне превращения сукцинил-КоА в сукцинат [17, 18], компенсирующего ингибирование окислительного фосфорилирования. После 8 недель в группе Д содержание глутаминовой кислоты было достоверно снижено, а аланина – увеличено, по-видимому, вследствие трансаминирования гликолитического пирувата в аланин по сравнению с контролем (табл. 4). Реакция трансаминирования между глутаминовой кислотой и оксалоацетатом может объяснить факт двукратного увеличения содержания аспарагиновой кислоты в группе Д по сравнению с контролем. Под действием пептида G в группе Д+G происходило восстановление содержания глутаминовой кислоты в сердце и снижение содержания аланина до значений, не отличающихся от таковых в контрольной группе. Одновременно в группе Д+G отмечено снижение уровня аспарагиновой кислоты до значения в контроле. Таким образом, улучшение энергетического состояния сердца при совместном введении пептида G и Докс предотвращало потери глутаминовой кислоты. Введение пептида G в течение 8 недель не приводило к достоверным изменениям

в содержании этих аминокислот в сердце по сравнению со значениями в контроле.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ

Впервые продемонстрирована способность пептида G – оригинального фармакологического лиганда рецепторов галанина – улучшать функцию сердца крыс при ХСН, вызванной Докс. Снижение кардиотоксического действия Докс при введении пептида G подтверждено уменьшением активности в крови КК-МВ – маркера повреждения сердечной мышцы. Под действием пептида G происходило улучшение метаболического состояния миокарда, поврежденного Докс, на что прямо указывает более высокий уровень макроэргических фосфатов в сердце и дыхательного контроля в митохондриях, а также восстановление нормального содержания лактата, глюкозы и аминокислот, связанных с регуляцией энергетического обмена. Вероятно, защитное действие пептида G при повреждении сердца Докс связано с его антиоксидантными свойствами. Об этом свидетельствует существенное снижение концентрации продуктов перекисного окисления липидов ТБКАП в крови животных, указывающее на уменьшение окислительного стресса. Для понимания механизмов действия пептида на метаболизм миокарда в дальнейшем представляется целесообразным изучение роли активации рецептора GalR2 и путей передачи сигнала в кардиомиоцитах. Несмотря на разработку новых антрациклинов с минимальной кардиотоксичностью, Докс остаётся препаратом, обладающим высоким противоопухолевым эффектом, что в свою очередь требует эффективной коррекции химиотерапевтического лечения для снижения повреждений сердечно-сосудистой системы. Результаты настоящей работы указывают на возможность применения нового агониста рецепторов галанина пептида G в качестве эффективного средства метаболической терапии.

## БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы признательны др. А.В. Просвирнину за проведение ЭхоКГ исследования и обработку результатов.

## ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (гранты 18-015-00008 и 18-015-00009).

Таблица 4. Влияние Докс и пептида G на содержание аминокислот, лактата и глюкозы в сердце крысы

Показатель	8 недель			
	К (n=12)	Д (n=12)	Д+G (n=12)	G (n=12)
Лактат	5,30±0,86	23,44±3,10*	13,76±1,52* <sup>#</sup>	8,69±0,93 <sup>#</sup>
Глюкоза	11,15±1,00	27,95±3,92*	15,74±1,36 <sup>#</sup>	14,02±1,03 <sup>#</sup>
Глутаминовая кислота	23,95±1,83	14,13±1,15*	23,92±1,26 <sup>#</sup>	26,38±1,70 <sup>#</sup>
Аспарагиновая кислота	2,68±0,43	5,85±0,80*	3,33±0,66 <sup>#</sup>	2,88±0,37 <sup>#</sup>
Аланин	3,21±0,36	11,82±0,58*	4,69±0,54* <sup>#</sup>	4,06±0,32 <sup>#</sup>

Примечание. Данные выражены в мкмоль/г сух. веса. Достоверно отличается (p<0,05) от: \* – К, # – Д.

**СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ**

Все эксперименты на животных проводили в соответствии с Международными рекомендациями “Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях” (The European Convention, 1986).

**ЛИТЕРАТУРА**

1. Wojtacki J., Lewicka-Nowak E., Lesniewski-Kmak K. (2000) Med. Sci. Monitor, **6**(2), 411-420.
2. Minotti G., Menna P., Salvatorelli E. et al. (2004) Pharmacol. Rev., **56**, 185-229. DOI: 10.1124/pr.56.2.6.
3. Tokarska-Schlattner M., Zaugg M., da Silva R. et al. (2005) Am. J. Physiol., **289**(1), H37-H47. DOI: 10.1152/ajpheart.01057.2004
4. Octavia Y., Tocchetti C.G., Gabrielson K.L. et al. (2012) J. Mol. Cell. Cardiol., **52**(6), 1213-1225. DOI: 10.1016/j.yjmcc.2012.03.006
5. Timotin A., Pisarenko O., Sidorova M. et al. (2017) Oncotarget, **8** (13), 21241-21252. PMID: 28177906 PMCID: PMC5400580 DOI: 10.18632/oncotarget.15071
6. Serebryakova L., Pal'keeva M., Studneva I. et al. (2018) Peptides, DOI: 10.1016/j.peptides.2018.05.001
7. Pisarenko O., Timotin A., Sidorova M. et al. (2017) Oncotarget, **8**(60), 101659-101671. DOI: 10.18632/oncotarget.21503
8. Bergmeyer H.U. (1974) in: Methods of enzymatic analysis. New York: Academic Press. (pp. 1464-1467, 1772-1776, 1777-17781, 2127-2131).
9. Kuznetsov A.V., Veksler V., Gellerich F.N. et al. (2008) Nature Protocols, **3**(6), 965-976. DOI: 10.1038/nprot.2008.61
10. Aldini G., Facino R.M., Beretta G., Carini M. (2005) Biofactors, **24** (1-4), 77-87.
11. Lygate C.A., Neubauer S. (2014) Circ. Res., **114**(8), 1228-1230. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.114.303551
12. Zervou S., Whittington H.J., Russell A.J., Lygate C.A. (2016) Mini-Rev. Med. Chem., **16**(1), 19-28. DOI: 10.2174/1389557515666150722102151
13. Sayed-Ahmed M.M., Shouman S.A., Rezk B.M. et al. (2000) Pharmacol. Res., **41**, 143-150.
14. Hrelia S., Fiorentini D., Maraldi T. et al. (2002) Biochim. Biophys. Acta, **1567**, 150-156.
15. Freminet A. (1981) Coup. Biochem. Physiol., **70B**, 427-433.
16. Safer B. (1975) Circ. Res., **37**, 527-534.
17. Taegtmeyer H. (1978) Circ. Res., **43**, 808-815.
18. Sanborn T., Gavin W., Berkowitz S., et al. (1979) Am. J. Physiol., **273**, H535-H541.

Поступила в редакцию: 26. 10. 2018.  
После доработки: 09. 01. 2019.  
Принята к печати: 10. 01. 2019.

**PROTECTIVE ACTION OF A MODIFIED FRAGMENT OF GALANINE  
IN RATS WITH DOXORUBICIN-INDUCED HEART FAILURE**

**I.M. Studneva, M.E. Palkeeva, O.M. Veselova, A.S. Molokoedov, R.O. Lubimov,  
M.V. Ovchinnikov, M.V. Sidorova, O.I. Pisarenko\***

National Medical Research Center for Cardiology,  
15a 3<sup>rd</sup> Cherepkovskaya str., Moscow, 121552 Russia; \*e-mail: olpi@live.ru

The use of the anticancer drug doxorubicin (Dox) is limited due to its cardiotoxic effect. Using the method of automatic solid-phase peptide synthesis, we obtained a synthetic agonist of galanin receptors GalR1-3 [PAla14, His15]-galanine (2-15) (G), exhibiting cardioprotective properties. It was purified by high performance liquid chromatography (HPLC). The homogeneity and structure of the peptide was confirmed by HPLC, <sup>1</sup>H-NMR spectroscopy and mass spectroscopy. The purpose of this study was to study the effect of G on the metabolism and cardiac function of rats with chronic heart failure (CHF) caused by Dox. Experiments were performed using male Wistar rats weighing 280-300 g. The control group of animals (C) was intraperitoneally treated with saline for 8 weeks; the doxorubicin group (D) of rats was intraperitoneally treated with Dox; the group of Dox + peptide G (D+G) received intraperitoneally injections of Dox and subcutaneously injections of peptide G; the peptide G group (G) was subcutaneously treated with G. At the beginning and at the end of the study, the concentration of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) and the activity of creatine kinase-MB (CK-MB) were determined in blood plasma; the animals were weighed, and cardiac function was assessed using echocardiography. At the end of the experiments, the hearts were used for determination of metabolites and assessment of oxidative phosphorylation in mitochondria. After 8-week treatment, animals of group D were characterized by severe heart failure, the lack of weight gain and an increase in plasma TBARS concentration and CK-MB activity. These disorders were accompanied by a decrease in the content of myocardial high-energy phosphates, a reduction in mitochondrial respiratory parameters, accumulation of lactate and glucose in the heart, and disturbances in the metabolism of alanine and glutamic and aspartic acids. Coadministration of G and Dox prevented the increase in plasma CK-MB activity and significantly reduced the plasma TBARS concentration. At the end of the experiments animals of group D+G had higher myocardial energy state and the respiratory control index of mitochondria than animals of group D, there was a decrease in anaerobic glycolysis and no changes in the amino acid content compared to the control. The peptide G significantly improved the parameters of cardiac function and caused weight gain in animals of group D+G in comparison with these parameters in group D. The obtained results demonstrate the ability of a novel agonist of galanin receptors GalR1-3 to attenuate Dox-induced cardiotoxicity.

**Key words:** doxorubicin; cardiotoxic effect; galanine; heart failure; myocardial metabolism