

© Коллектив авторов

КАРДИОМЕТАБОЛИЧЕСКАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ И ТОКСИКОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОГО АГОНИСТА РЕЦЕПТОРОВ ГАЛАНИНА

Л.И. Серебрякова, М.Е. Палькеева, И.М. Студнева, М.В. Овчинников, О.М. Веселова, А.С. Молокоедов, А.А. Азьмуко, Е.В. Арзамасцев, Е.Ю. Афанасьева, О.А. Терехова, М.В. Сидорова, О.И. Писаренко*

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

Цель исследования состояла в изучении влияния нового синтетического агониста рецепторов галанина GalR1-3 [β Ala⁴, His¹⁵]-галанин 2-15 (G), полученного методом автоматического твердофазного синтеза, на метаболическое состояние зоны риска (ЗР) и размеры острого инфаркта миокарда (ОИМ) у крыс *in vivo* и изучении его токсичности при однократном введении мышам линии BALB/c. ОИМ моделировали у наркотизированных крыс Wistar окклюзией коронарной артерии и последующим восстановлением коронарного кровотока. Пептид G вводили внутривенно (в/в) после периода региональной ишемии в диапазоне доз 0,25-3,0 мг/кг. Оценивали размеры ОИМ, активность МВ-фракции креатинкиназы (МВ-КК) и лактатдегидрогеназы (ЛДГ) в плазме крови. Изучено влияние введения оптимальной дозы G 1,0 мг/кг на содержание в миокарде адениннуклеотидов (АН), фосфокреатина (ФКр), креатина (Кр) и лактата. Токсичность G изучали при однократном внутривенном введении мышам 0,5-3,0% раствора субстанции пептида. В/в введение G крысам в дозе 1,0 мг/кг незначительно изменяло гемодинамические показатели, но уменьшало размеры ОИМ на 40% и снижало активность ЛДГ и МВ-КК в плазме к концу реперфузии по сравнению с контролем. Это сопровождалось достоверным улучшением метаболического состояния ЗР – увеличением содержания АТФ, общего фонда адениннуклеотидов (Σ АН), ФКр, общего креатина (Σ Кр) и снижением уровня лактата. Отсутствие признаков интоксикации и гибели животных при однократном введении G в максимально возможной дозе не позволили установить величину дозы ЛД₅₀. Результаты указывают на возможность использования пептида G для снижения ишемических и реперфузионных повреждений сердца и необходимость дальнейшего изучения его фармакологических свойств и механизмов действия.

Ключевые слова: галанин; крыса; ишемия и реперфузия сердца; энергетическое состояние миокарда; токсичность

DOI: 10.18097/PBMC20196503231

ВВЕДЕНИЕ

Разработка подходов к снижению повреждения сердца, вызванного ишемическим и реперфузионным повреждением, является актуальной задачей экспериментальной молекулярно-клеточной кардиологии. В последние годы внимание исследователей привлекает изучение сопряжённых с G-белками рецепторов эндотелиальных и гладкомышечных клеток коронарных сосудов и кардиомиоцитов [1, 2]. Лиганды этих рецепторов инициируют механизмы запрограммированного клеточного выживания, которые запускаются каскадами реперфузионных киназ. К таким соединениям относится нейропептид галанин, состоящий из 29 аминокислотных остатков (а.о.) у большинства видов животных (и 30 а.о. у человека) [3]. В периферических органах, включая сердце, галанин действует не только через нейрональные механизмы, но и активируя семейство трансмембранных рецепторов GalR1-3 [4]. Хотя рецепторы GalR1-3 являются потенциальной мишенью для лечения различных заболеваний, данных о влиянии галанина на сердечно-сосудистую систему немного [2]. Показано, что введение экзогенного галанина в определённые отделы мозга способно оказывать гипотензивный эффект и вызывать тахикардию у крыс [5]. Галанин снижает резистентность к инсулину и улучшает поглощение глюкозы в диабетическом сердце, что представляет ценность

для изучения сочетанных расстройств [6]. Выделяющийся из сердечных симпатических нейронов сердца галанин ингибирует холинергическую нейротрансмиссию и стимулирует регенерацию аксонов в сердце при ишемии [7]. При гипоксии отмечено положительное инотропное действие галанина, связанное с улучшением сократимости папиллярной мышцы сердца морской свинки [8]. Эти данные указывают на возможность участия галанина в механизмах защиты сердца от ишемического и реперфузионного повреждения.

За связывание с рецепторами отвечает N-концевой фрагмент галанина, первые 15 аминокислотных остатков которого консервативны у большинства видов [9, 10]. Одним из наиболее изученных агонистов рецепторов GalR1-3 является галанин (2-11)-амид. Он обладает более высокой аффинностью к рецептору GalR2, чем к GalR1 и в меньшей степени связывается с рецептором GalR3 [11, 12]. Ранее нами было показано, что этот пептид улучшает восстановление функции изолированного сердца крысы после тотальной ишемии и ограничивает размеры ОИМ у крыс *in vivo* после региональной ишемии и реперфузии сердца [13]. Эти эффекты обусловлены снижением образования активных форм кислорода, ингибированием апоптоза и связаны с улучшением энергетического состояния сердца [14]. Впоследствии нами был синтезирован ряд пептидных аналогов фрагментов галанина (2-11) и (2-15) с сохранением

фармакофорных аминокислотных остатков, ответственных за связывание с рецептором GalR2. Тестирование этих пептидов на моделях ишемического и реперфузионного повреждения сердца продемонстрировало их кардиотропные свойства [15]. Наиболее эффективной оказалась химерная молекула G, представляющая собой последовательность галанина (2-13), дополненную природным дипептидом карнозин (H-Trp-Thr-Leu-Asn-Ser-Ala-Gly-Tyr-Leu-Leu-Gly-Pro-βAla-His-OH) [16, 17]. Настоящая работа является продолжением исследований в этой области. Её целью было изучение влияния пептида G на размеры ОИМ, повреждения мембран кардиомиоцитов и метаболическое состояние ЗР у крыс *in vivo*, а также исследование токсичности этого соединения при однократном введении лабораторным животным.

МЕТОДИКА

Модифицированный фрагмент галанина G

Пептид G (H-Trp-Thr-Leu-Asn-Ser-Ala-Gly-Tyr-Leu-Leu-Gly-Pro-βAla-His-OH, молекулярная масса – 1499,7 Да) получен путём ступенчатого твердофазного синтеза с использованием Fmoc-методологии [15]. Он был очищен методом высокоэффективной жидкостной хроматографии на обращённой фазе, его структура охарактеризована с помощью ¹H-ЯМР-спектроскопии и MALDI-масс-спектрометрии [16].

Животные

Для изучения влияния пептида на сердце при ишемии и реперфузии использовали самцов крыс Wistar (300-350 г). Исследование токсичности субстанции пептида проведено на самцах мышей линии BALB/c (20-24 г). Животных содержали в виварии в условиях естественного освещения и свободного доступа к воде и корму.

Модель региональной ишемии и реперфузии у крыс in vivo

У наркотизированных 20% уретаном (1200 мг/кг веса внутривенно) крыс Wistar в условиях торакотомии осуществляли искусственную вентиляцию лёгких комнатным воздухом с помощью аппарата KTR-5 (“Hugo Sacks Electronik”, Германия). Яремную вену катетеризировали для окрашивания сердца 1% раствором Эванса в конце опыта. Сонную артерию катетеризировали для регистрации артериального давления. После присоединения артериального катетера к тензометрическому датчику регистрировали систолическое артериальное давление (САД) и частоту сердечных сокращений (ЧСС) на полиграфе Biograph-4 (Санкт-Петербургский госуниверситет аэрокосмического приборостроения). Запись на компьютер выполнена с помощью аналого-цифрового преобразователя USB 6210 (“National Instruments”, США) и программы в системе LabView 7 (“National Instruments”) [13].

После окончания препарирования животного следовал 30-минутный период стабилизации

гемодинамических показателей (исходное состояние), затем окклюзия передней нисходящей коронарной артерии (ПНА) в течение 40 мин, продолжительность последующей реперфузии составляла 60 мин. В экспериментальной серии после периода региональной ишемии внутривенно болюсом вводили пептид G в дозах 0,25 мг/кг; 0,5 мг/кг; 1,0 мг/кг; 2,0 мг/кг или 3,0 мг/кг веса одновременно с началом реперфузии; в контрольной серии опытов – такой же объём физиологического раствора (0,5 мл). В отдельной серии опытов было изучено влияние растворителя пептида G – 0,2% раствора диметилсульфоксида (ДМСО) – на размеры ОИМ. В конце опыта для идентификации ЗР и интактной области миокарда реокклюзировали ПНА и в яремную вену вводили болюсно 2% раствор Эванса (2 мл). Затем вырезали сердце и выделяли левый желудочек (ЛЖ) для фиксирования последующего определения размеров ИМ.

Определение размеров острого инфаркта миокарда

Замороженный ЛЖ разрезали перпендикулярно длинной оси сердца на 4–5 срезов толщиной около 1,5–2,0 мм, которые затем инкубировали 10 мин в 1% растворе 2,3,5-трифенилтетразолий хлорида в 0,1 М калий-фосфатном буфере (рН 7,4 при 37°C). Полученные образцы сканировали, площади ОИМ и ЗР определяли методом компьютерной планиметрии, используя программу Imagesal. После этого срезы взвешивали для определения массы ЛЖ. В каждой группе рассчитывали отношения зона риска/вес левого желудочка (ЗР/ЛЖ) и острый инфаркт миокарда/зона риска (ОИМ/ЗР) в % [18].

Оценка повреждения клеточных мембран

Повреждение мембран кардиомиоцитов оценивали по увеличению активности ЛДГ и МВ-КК в плазме крови. Около 0,5 мл крови собирали в гепаринизированные пробирки из венозного катетера в исходном состоянии (перед окклюзией ПНА) и после часа реперфузии. Активность ферментов в плазме определяли на спектрофотометре Shimadzu UV-1800 (Япония) при λ=340 нм, используя наборы фирмы “BioSystems SA” (Испания).

Оценка энергетического состояния ЗР

В отдельной серии опытов оценивали влияние внутривенного введения оптимальной дозы пептида (1,0 мг/кг) на энергетическое состояние ЗР. По окончании реперфузии ЗР быстро выделяли из ЛЖ и замораживали щипцами Волленбергера, охлаждёнными в жидком азоте. Замороженную ткань гомогенизировали в холодной 6% HClO₄ (10 мл/г ткани) в гомогенизаторе Ultra-Turrax T-25 (“IKA-Labortechnik”, Германия). Белки осаждали центрифугированием (центрифуга Sorvall RT1, “Thermo Fisher Scientific”, США) при 2800 g в течение 10 мин при 4°C. Супернатанты нейтрализовали 5 М K₂CO₃ до рН 7,4. Осадок KClO₄ 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. Содержание адениннуклеотидов, ФКр, Кр и лактата в тканевых экстрактах определяли энзиматическими методами [19], используя спектрофотометр Shimadzu UV-1800 и выражали в мкмоль/г сухого веса. Таким же образом оценивали метаболическое состояние ЗР в конце реперфузии в контроле (в опытах с внутривенным введением физиологического раствора) и в исходном состоянии (до окклюзии ПНА).

Изучение токсичности субстанции пептида G

Субстанцию пептида G растворяли в физиологическом растворе и вводили мышам однократно внутрибрюшинно в виде 0,5-3,0% растворов. Длительность наблюдения за подопытными животными после введения препарата составляла 14 дней. Оценка параметров токсичности проведена с использованием метода Deichman и Le Blanc [20] для определения средней смертельной дозы ЛД₅₀. Использовали шкалу доз, в которой каждая последующая испытуемая доза выше предыдущей примерно на 50%. Первая доза, при которой наблюдается гибель животного, принималась за ориентировочную ЛД₅₀, а предшествующая ей доза с выжившим животным – за максимально переносимую дозу.

Статистика

Использован пакет программ SigmaPlot 11.2 ("SysStat", США). Значения выражены как среднее значение ± стандартная ошибка среднего значения (M±m). При сравнении нескольких групп с контролем использовали t-критерий Стьюдента с поправкой Бонферрони. Статистически значимыми отличия считали при p<0,05.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Уменьшение повреждения сердца, вызванного ишемией и реперфузией

В исходном состоянии среднее систолическое артериальное давление (САД) было практически одинаковым во всех группах и составляло

83±2 мм рт. ст., ЧСС – 330±5 мин⁻¹. Внутривенное введение физиологического раствора или растворителя пептида G (0,2% ДМСО) после региональной ишемии не приводило к изменению САД и ЧСС при реперфузии. Введение пептида G в дозах 0,25 мг/кг; 0,5 мг/кг; 1,0 мг/кг; 2,0 мг/кг или 3,0 мг/кг веса одновременно с началом реперфузии приводило к незначительному снижению САД, которое возрастало с увеличением дозы. Для диапазона доз 1,0-3,0 мг/кг снижение САД ко второй минуте реперфузии составляло в среднем 15±3% от исходного уровня (p<0,05). К окончанию реперфузии САД восстанавливалось до исходного значения. Под действием указанных доз пептида G происходило незначительное снижение ЧСС в среднем на 7±1% от исходного уровня на первой минуте реперфузии и практически полное восстановление этого параметра к окончанию реперфузии. В качестве примера в таблице показаны изменения САД и ЧСС в ходе опыта при введении оптимальной дозы пептида галанина 1,0 мг/кг.

Мы изучили влияние пептида G на размеры ОИМ и активность маркеров некроза в плазме крови крыс в конце реперфузии. Гистохимический анализ срезов ЛЖ после реперфузии не выявил достоверных различий в ЗР между контролем и группами ДМСО и G (на рисунке 1А в качестве примера показана ЗР для дозы G 0,1 мг/кг). Это означает, что ишемическое и реперфузионное повреждение было моделировано одинаково у всех животных. Для исследованных групп величина ЗР/ЛЖ в среднем составляла 40,4±1,2%. В контроле величина ОИМ, выраженная отношением ИМ/ЗР в %, составляла 43,0±2,0%. Введение 0,2% ДМСО не влияло на этот показатель. Под действием пептида G в дозе 1,0 мг/кг размер ОИМ достоверно снижался на 40% по сравнению с контролем. Развитие ОИМ в контроле сопровождалось значительным увеличением активности в плазме МВ-КК и ЛДГ к концу реперфузии по сравнению с исходным состоянием (рис. 1Б,В). Введение 0,2% ДМСО не влияло на активность обоих ферментов по сравнению со значениями в контроле. Введение оптимальной дозы пептида G достоверно уменьшало активность ЛДГ и МВ-КК к окончанию реперфузии на 32% по сравнению с контролем.

Таблица. Влияние внутривенного введения пептида G на стадии ранней реперфузии на гемодинамические показатели у крыс *in vivo*

Группа	Исходное состояние	Реперфузия	
		2-3 мин	60 мин
Систолическое артериальное давление, мм рт. ст.			
Контроль	83±2	74±4	82±4
ДМСО	84±3	76±4	82±3
G, 1,0 мг/кг	85±2	75±4*	84±4
Частота сокращений сердца, мин ⁻¹			
Контроль	321±10	309±10	308±11
ДМСО	328±9	313±9	319±8
G, 1,0 мг/кг	340±8	323±8*	327±10

Примечание. ДМСО – 0,2% в физиологическом растворе. Средние данные представлены как M±m для групп из 9 животных. * – Достоверное отличие (p<0,05) от исходного состояния.

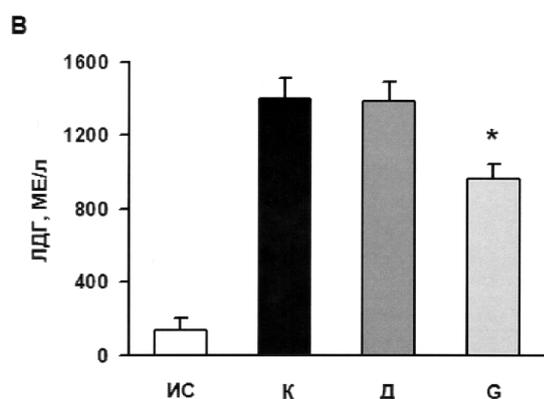
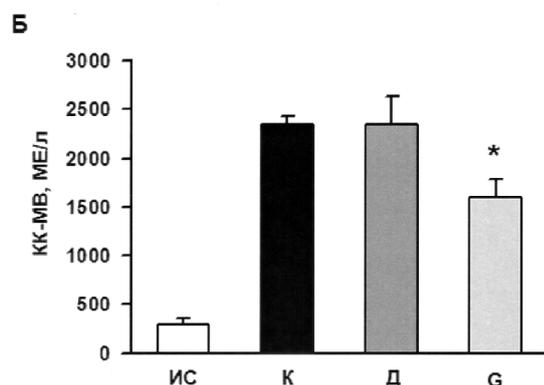
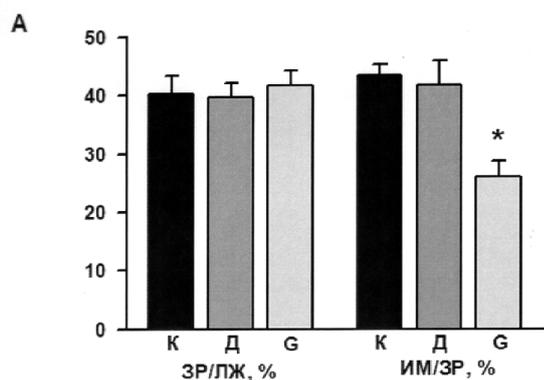


Рисунок 1. Влияние внутривенного введения пептида G на размеры инфаркта миокарда (А) и активность креатинкиназы-МВ (Б) и лактатдегидрогеназы (В) в плазме крови крыс в конце реперфузии. ИС – исходное состояние, К – контроль (введение физиологического раствора), Д – 0,2% ДМСО, Г – пептид G (1,0 мг/кг). Данные представлены как $M \pm m$ для групп из 8 животных. * – Достоверно отличается ($p < 0,05$) от группы К и Д.

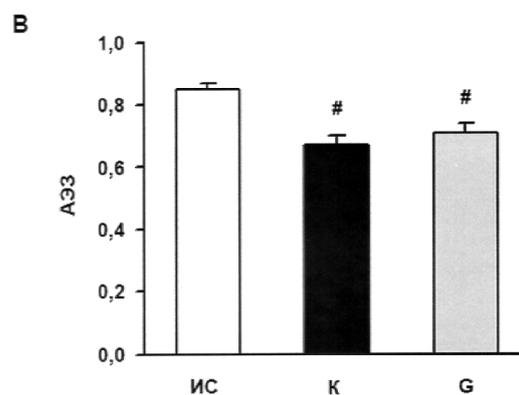
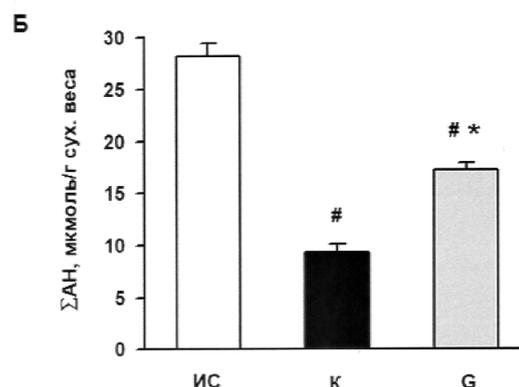
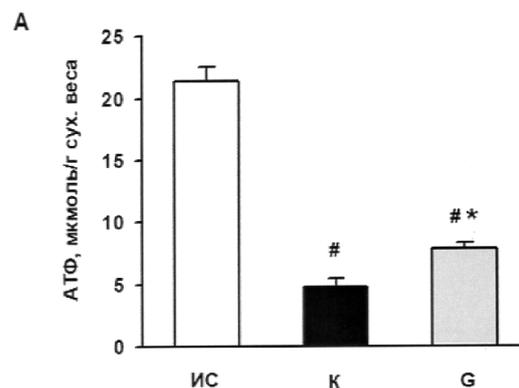


Рисунок 2. Влияние внутривенного введения пептида G на содержание адениннуклеотидов (А и Б) и аденилатный энергетический заряд (С) в миокарде крыс в конце реперфузии. $\Sigma АН = АТФ + АДФ + АМФ$. $АЭЗ = (АТФ + 0,5АДФ) / \Sigma АН$. ИС – исходное состояние, К – контроль (введение физиологического раствора), Г – пептид G (1,0 мг/кг). Данные представлены как $M \pm m$ для групп из 6 животных. Достоверно отличается ($p < 0,05$) от: # ИС, * К.

Сопоставление показателей метаболического состояния ЗР в конце реперфузии с исходным состоянием показано на рисунках 2 и 3. Ишемическое и реперфузионное повреждение вызывало значительные изменения в содержании макроэргических фосфатов и лактата в сердце. В контроле в конце реперфузии содержание АТР и $\Sigma АН$ было снижено в 4,5 и 3 раза, соответственно, по сравнению с исходным состоянием, а аденилатный энергетический заряд (АЭЗ)

кардиомиоцитов составлял 78% от значения в исходном состоянии. Содержание ФКр было снижено до 35%, что вызывало уменьшение $\Sigma Кр$ до 64% от исходных значений при практически неизменном уровне креатина. Недостаточное восстановление энергетического обмена в ЗР к окончанию реперфузии сочеталось с накоплением лактата, содержание которого увеличилось почти в 6 раз по сравнению с исходным значением до ишемии. Введение пептида G достоверно

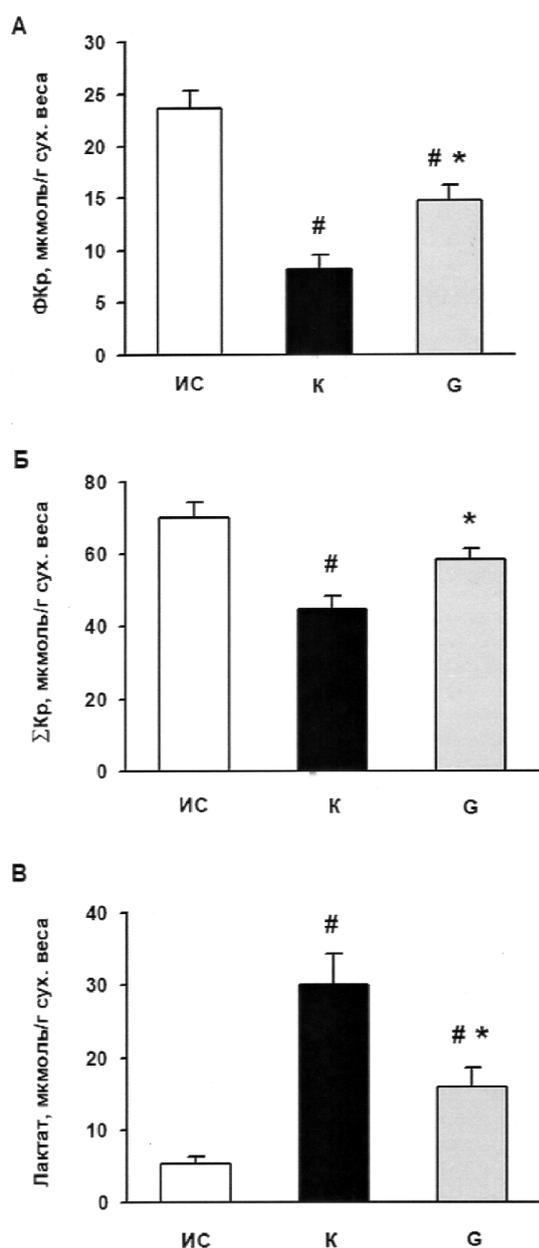


Рисунок 3. Влияние внутривенного введения пептида G на содержание фосфокреатина (А), общего креатина (Б) и лактата (С) в миокарде крыс в конце реперфузии. $\Sigma\text{Кр} = \text{ФКр} + \text{Кр}$. ИС – исходное состояние, К – контроль (введение физиологического раствора), G – пептид G (1,0 мг/кг). Данные представлены как $M \pm m$ для групп из 6 животных. Достоверно отличается ($p < 0,05$) от: # ИС, * К.

увеличивало содержание АТФ и $\Sigma\text{АН}$ по сравнению с контролем, но достоверно не увеличивало АЭЗ. Одновременно отмечено лучшее восстановление ФКр и сохранение $\Sigma\text{Кр}$ (на 80 и 30%, соответственно), которое сопровождалось снижением содержания лактата вдвое по сравнению с контролем.

Полученные данные указывают на уменьшение ишемического и реперфузионного повреждения сердца миокарда у животных *in vivo* под действием пептида G при незначительных изменениях гемодинамических показателей.

Исследование токсичности субстанции пептида

Однократные внутрибрюшинные введения субстанции пептида G мышам линии BALB/c в диапазоне доз 37-520 мг/кг не вызывали каких-либо признаков интоксикации и гибели животных в течение 14 дней наблюдения. Высшая из испытанных доз вещества (520 мг/кг) оказалась максимально возможной из-за ограничения по растворимости. Она в 520 раз превышала разовую терапевтическую дозу вещества, рекомендованную для человека (1 мг/кг). Отсутствие признаков интоксикации веществом и гибели животных при однократном введении пептида в максимально возможной дозе по техническим причинам (ограничения по растворимости) не позволили установить показатель средней смертельной дозы LD_{50} . Таким образом, установлена хорошая переносимость пептида G при внутрибрюшинном введении мышам.

Механизмы действия пептида G

В настоящей работе критериями защиты от региональной ишемии миокарда и реперфузии у наркотизированных крыс *in vivo* при изучении пептида G служили: 1) размеры ОИМ, 2) активность маркеров некроза (МВ-КК и ЛДГ) в плазме крови и 3) метаболическое состояние ЗР в конце реперфузии. С помощью этого подхода экспериментально подтверждена возможность эффективного снижения повреждения миокардиальной ткани и улучшения метаболизма реперфузированного сердца под действием оптимальной дозы пептида, введенной в начальной стадии реперфузии. Существенно, что защитное действие пептида не сопровождалось значительными изменениями гемодинамических показателей. Эти результаты предполагают, что фармакологическое посткондиционирование пептидом G может обладать терапевтическим потенциалом, способным уменьшать размеры поражённого участка миокарда и корректировать его метаболизм при остром инфаркте.

Многочисленные экспериментальные данные указывают на принципиальную роль медиаторного компонента и активации вторичных посредников в реализации инфаркт-лимитирующего и метаболического эффекта посткондиционирования – протеинкиназ, регулируемых внеклеточными сигналами (ЕРК), фосфатидилинозитол-3 киназы (PI3K), функционально сопряжённой с Akt (протеинкиназа B), а также протеинкиназы G (PKG) и протеинкиназы C (PKC) [21]. Эти механизмы запускаются при связывании пептида G с рецептором GalR2, приводя к ингибированию каспаз 3 и 9 и закрытию митохондриальной поры (mPTP) [22]. Активация митогенактивированных протеинкиназ (МАРК) способна подавлять гибель клеток при реперфузии благодаря активированию фактора транскрипции NF- κB и экспрессии антиапоптотических генов Bcl-X1, X-IAP, c-IAP-1 и c-IAP-2 [23]. Сигнализация через рецептор GalR2 активирует также фосфолипазу C (PLC), которая гидролизует мембранный фосфатидилинозитол-4,5-дифосфат с образованием инозитол-1,4,5-трифосфата. При этом инициируется выход Ca^{2+} из эндоплазматического

ретикулума и открытие Ca^{2+} -зависимого хлоридного канала – механизмов, участвующих в регуляции сократимости ишемизированных кардиомиоцитов. Метаболической адаптации сердца при активации рецептора GalR2 способствует ингибирование белка, связывающего с АМР-зависимый элемент (CREB). Это в свою очередь увеличивает экспрессию переносчика глюкозы GLUT4 и его транслокацию к сарколемме и, таким образом, захват глюкозы, что может компенсировать нарушения энергетического обмена в клетках. Этот механизм критически важен в условиях ишемии и ранней реперфузии для обеспечения продукции АТФ в реакциях анаэробной и аэробной утилизации глюкозы [24]. Таким образом, посткондиционирование сердца пептидом G связано с повышением эффективности метаболических путей образования энергии, поддержкой ионного гомеостаза и уменьшением необратимого повреждения ишемизированных кардиомиоцитов.

Феномен ишемического и фармакологического посткондиционирования хорошо подтвержден на лабораторных животных и в опытах с клеточными моделями [25]. В отличие от этого, более сложный характер миокардиального поражения у человека, обусловленный наличием атеросклероза, гипертонии, диабета, инсулиновой резистентности и старением, осложняет оценку действия посткондиционирования. Тем не менее, в большинстве клинических наблюдений обнаружено позитивное влияние посткондиционирования на течение ОИМ. При этом отмечено уменьшение очага некроза, меньшее повышение активности маркерных ферментов и лучшее сохранение функционального состояния миокарда после ОИМ. Подтверждена эффективность использования посткондиционирования для защиты сердца от ишемических и реперфузионных повреждений во время выполнения кардиохирургических вмешательств [26]. Применение фармакологических агентов в период ранней реперфузии, уменьшающих ишемическое и реперфузионное повреждение сердца, может быть эффективным дополнением к существующим методам защиты. К настоящему времени в клинических исследованиях изучено действие лишь незначительного числа таких соединений. Попытки имитации посткондиционирования с помощью внутривенного введения его триггера аденозина предпринимались у пациентов с ОИМ и ангиопластикой инфаркт-связанной коронарной артерии [27]. Более поздние исследования подтвердили кардиопротекторный эффект аденозина у пациентов с ОИМ [28]. Однако данные многоцентрового исследования AMISTAD-II (Acute Myocardial Infarction Study of Adenosine) показали, что инфузия аденозина способствует уменьшению размера зоны инфаркта, но не оказывает существенного эффекта на течение ОИМ [29]. Цитостатик циклоsporин А, являющийся блокатором митохондриальной поры транзитной проницаемости (mPTP), воспроизводил ограничение ОИМ у пациентов, вызванное подъемом сегмента ST [30]. По данным МРТ, этот препарат при внутривенном введении уменьшал размер зоны инфаркта,

снижал пик активности МВ-КК и предупреждал постинфарктное ремоделирование сердца [31]. Сочетание защиты миокарда кардиоплегическим раствором “Консол” с посткондиционированием ингаляционным анестетиком севофлураном приводило к повышению резистентности миокарда к ишемическому и реперфузионному повреждению у пациентов с ОИМ [32]. Под действием севофлурана наблюдалось лучшее самостоятельное восстановление сердечного ритма после снятия зажима с аорты, снижение частоты эпизодов ишемии миокарда и аритмий в период реперфузии. Успешная апробация имитации посткондиционирования с помощью морфина была проведена у пациентов с тетрадой Фалло. Введение морфина в корень аорты через кардиоплегическую иглу перед снятием зажима с аорты снижало выход тропонина I, уменьшало инотропную поддержку и увеличивало сердечный выброс [33]. Мы полагаем, что в дополнении к вышеперечисленным фармакологическим агентам в качестве средства адьювантной терапии для профилактики реперфузионных повреждений сердца может быть использован пептид G. Важно, что одним из результатов этой работы является обнаружение низкой токсичности этого соединения, которая не позволила оценить величину LD_{50} у экспериментальных животных. Эти данные указывают на перспективность дальнейшего изучения фармакологических свойств и механизмов действия этого биологически активного пептида.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ

Нами разработана лабораторная технология получения и очистки нового фармакологического агониста рецептора галанина GalR2 – пептида $[\beta\text{Ala}^{14}, \text{His}^{15}]$ -галанин 2-15 (G). Внутривенное введение пептида G крысам оказывает защитное действие при моделировании ишемического и реперфузионного повреждения сердца *in vivo*. Его эффект проявляется в уменьшении гибели кардиомиоцитов от некроза – ограничении ОИМ, снижении активности МВ-КК и ЛДГ в крови, указывающем на интегрированность сарколеммы и в улучшении метаболического состояния ЗР. Низкая токсичность и отсутствие признаков интоксикации и гибели животных при изучении токсичности пептида G при внутрибрюшинном введении мышам в сочетании с выраженными кардиопротекторными свойствами обосновывает целесообразность доклинического исследования и изучения фармакологических свойств этого соединения.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (гранты № 18-015-00008 и № 18-015-00009).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Исследование выполнено в соответствии с “Международными рекомендациями по проведению

биомедицинских исследований с использованием животных”, принятым Международным советом медицинских научных обществ в 1985 г (Женева).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Все авторы заявляют об отсутствии потенциального конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

ЛИТЕРАТУРА

- Foster S.R., Roura E., Molenaar P., Thomas W.G. (2015) *Biophys. Rev.*, **7**, 77-89.
- Wang J., Gareri C., Rockman H.A. (2018) *Circ. Res.*, **123**(6), 716-735.
- Mitsukawa K., Lu X., Bartfai T. (2008) *Cell. Mol. Life Sci.*, **65**(12), 1796-1805.
- Webling K., Runesson J., Bartfai T., Langel U. (2012) *Front. Endocrinol.*, **7**(3), 146.
- Abbott S., Pilowsky P. (2009) *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, **296**(4), R1019-R1026.
- He B., Shi M., Zhang L. Li G., Zhang L., Shao H., Li J., Fang P., Ma Y., Shi Q., Sui Y. (2011) *Physiol. Behav.*, **103**(3-4), 284-289.
- Alston E.N., Parrish D.C., Hasan W., Tharp K., Pahlmeyer L., Habecker B.A. (2011) *Neuropeptides*, **45**(1), 33-42.
- Kocic I. (1998) *J. Pharm. Pharmacol.*, **50**(12), 1361-1364.
- Diaz-Cabiale Z., Parrado C., Vela H., Razani H., Coveñas R., Fuxe K., Narváez J.A. (2005) *Neuropeptides*, **39**, 185-190.
- Liu H.X., Brumovsky P., Schmidt R., Brown W., Payza K., Hodzic L., Pou C., Godbout C., Hökfelt T. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 9960-9964.
- Runesson J., Saar I., Lundström L., Järv J., Langel U. (2009) *Neuropeptides*, **43**, 187-192.
- Hua X.Y., Hayes C.S., Hofer A., Fitzsimmons B., Kilk K., Langel U., Bartfai T., Yaksh T.L. (2004) *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **308**(2), 574-582.
- Шульженко В.С., Серебрякова Л.И., Студнева И.М., Пелогейкина Ю.А., Веселова О.М., Молокоедов А.С., Овчинников М.В., Палькеева М.Е., Сидорова М.В., Писаренко О.И. (2016) *Кардиологический вестник*, **11**(3), 12-21. [Shulzhenko V.S., Serebryakova L.I., Studneva I.M., Pelogeykina Yu.A., Veselova O.M., Molokoedov A.S., Ovchinnikov M.V., Palkeeva M.E., Sidorova M.V., Pisarenko O.I. (2016) *Kardiologicheskii vestnik*, **11**(3), 12-21.
- Timotin A., Pisarenko O., Sidorova M., Studneva I., Shulzhenko V., Palkeeva M., Serebryakova L., Molokoedov A., Veselova O., Cinato M., Tronchere H., Boal F., Kunduzova O. (2017) *Oncotarget*, **8**(13), 21241-21252.
- Азьмуко А.А., Веселова О.М., Молокоедов А.С., Овчинников М.В., Палькеева М.Е., Писаренко О.И., Серебрякова Л.И., Сидорова М.В., Студнева И.М. Патент РФ №2648846, зарегистрирован 28.03.2018, “Тетрадекапептиды, улучшающие восстановительную функцию сердечнососудистой системы при ишемии” [Azmuiko A.A., Veselova O.M., Molokoedov A.S., Ovchinnikov M.V., Palkeeva M.E., Pisarenko O.I., Serebryakova L.I., Sidorova M.V., Studneva I.M. Patent RF №2648846, zaregistririvan 28.03.2018, “Tetradekapeptidy, uluchshayushchie vosstanovitelnyuyu funktsiyu serdechno-sudustoj sistemy pri ishemii”]
- Palkeeva M., Studneva I., Molokoedov A., Serebryakova L., Veselova O., Ovchinnikov M., Sidorova M., Pisarenko O. (2019) *Biomed. Pharmacother.*, **109**, 1556-1562.
- Студнева И.М., Палькеева М.Е., Веселова О.М., Молокоедов А.С., Любимов Р.О., Овчинников М.В., Сидорова М.В., Писаренко О.И. (2019) *Биомед. химия*, **65**(1), 51-56. [Studneva I.M., Palkeeva M.E., Veselova O.M., Molokoedov A.S., Lubimov R.O., Ovchinnikov M.V., Sidorova M.V., Pisarenko O.I. (2019) *Biomeditsinskaya khimiya*, **65**(1), 51-56.]
- Kitakaze M., Takashima S., Funaya H., Minamino T., Node K., Shinozaki Y., Mori H., Hori M. (1997) *Am. J. Physiol.*, **272**, H2071-H2078.
- Bergmeyer H.U. (1974) *Methods of enzymatic analysis* (pp. 1464-1467, 1772-1776, 1777-1778, 2127-2131). New York: Academic Press.
- Deichman W.B., Le Blanc T.J. (1943) *J. Indust. Hyg. Toxicol.*, **25**(9), 415-417.
- Kaur S., Jaggi A.S., Singh N. (2009) *Fundam. Clin. Pharmacol.*, **23**(5), 521-536.
- Lang R., Gundlach A.L., Holmes F.E., Hobson S.A., Wynick D., Hökfelt T., Kofler B. (2015) *Pharmacol. Rev.*, **67**, 118-175.
- Рязанцева Н.В., Новицкий В.В., Кайгородова Е.В., Часовских Н.Ю., Старикова Е.Г. (2009) *Успехи физиол. наук*, **40**(2), 3-11. [Ryazantseva N.V., Novitskiy V.V., Kajgorodova E.V., Chasovskikh N.Yu., Starikova E.G. (2009) *Uspekhi fiziol. nauk*, **40**(2), 3-11.]
- Tian R., Abel E.D. (2001) *Circulation*, **103**(24), 2961-2966.
- Hausenloy D.J., Yellon D.M. (2007) *Pharmacol. Ther.*, **116**(2), 173-191.
- Маслов Л.Н., Мрочек А.Г., Халиулин И.Г., Хануш Л., Пей Ж.-М., Жанг И. (2013) *ВЕСТНИК РАМН*, **1**, 10-20. [Maslov L.N., Mrochek A.G., Khaliulin I., Hanush L., Pei J., Zhang Y. (2013) *Annals of the Russian academy of medical sciences*, **68**(1), 10-20.]
- Garratt K.N., Holmes D.R., Molina-Viamonte V., Reeder G.S., Hodge D.O., Bailey K.R., Lobl J.K., Laudon D.A., Gibbons R.J. (1998) *Am. Heart J.*, **136**(2), 196-204.
- Claeys M.J., Bosmans J., De Ceuninck M., Beunis A., Vergauwen W., Vorlat A., Vrints C.J. (2004) *Am. J. Cardiol.*, **94**(1), 9-13.
- Ross A.M., Gibbons R.J., Stone G.W., Kloner R.A., Alexander R.W. (2005) *J. Am. Coll. Cardiol.*, **45**(11), 1775-1780.
- Piot C., Croisille P., Staat P., Thibault H., Rioufol G., Mewton N., Elbelghiti R., Cung T.T., Bonnefoy E., Angoulvant D., Macia C., Racza F., Sportouch C., Gahide G., Finet G., André-Fouët X., Revel D., Kirkorian G., Monassier J.P., Derumeaux G., Ovize M. (2008) *N. Engl. J. Med.*, **359**(5), 473-481.
- Mewton N., Croisille P., Gahide G., Rioufol G., Bonnefoy E., Sanchez I., Cung T.T., Sportouch C., Angoulvant D., Finet G., André-Fouët X., Derumeaux G., Piot C., Vernhet H., Revel D., Ovize M. (2010) *J. Am. Coll. Cardiol.*, **55**(12), 1200-1205.
- Гришин А.В., Яворовский А.Г., Чарчян Э.Р., Федулова С.В., Чарная М.А. (2016) *Анестезиол. реаниматол.*, **61**(5), 348-352. [Grishin A.V., Yavorovsky A.G., Charchyan E.R., Fedulova S.V., Charnaya M.A. (2016) *Anesteziologiya i reanimatologiya*, **61**(5), 348-352.]
- Zhang R., Shen L., Xie Y., Gen L., Li X., Ji Q. (2013) *J. Cardiothorac. Surg.*, **8**, 76.

Поступила в редакцию: 13. 02. 2019.

После доработки: 13. 04. 2019.

Принята к печати: 16. 04. 2019.

**CARDIOMETABOLIC EFFICACY AND TOXICOLOGICAL EVALUATION
OF A PHARMACOLOGICAL GALANIN RECEPTOR AGONIST**

*L.I. Serebryakova, M.E. Pal'keeva, I.M. Studneva, M.V. Ovchinnikov, O.M. Veselova, A.S. Molokoedov,
A.A. Az'muko, E.V. Arzamastsev, E.Yu. Afunasyeva, O.A. Terekhova, M.V. Sidorova, O.I. Pisarenko**

National Medical Research Center for Cardiology,
15A, 3rd Cherepkovskaya str., Moscow, 121552 Russia; *e-mail: olpi@live.ru

The goal of this study was to examine effects of a novel galanin receptor agonist GalR1-3 [β Ala¹⁴, His¹⁵]-galanine 2-15 (G), obtained by automatic solid-phase synthesis, on the metabolic state of the area at risk and the size of acute myocardial infarction (MI) in rats *in vivo* and evaluate its toxicity in BALB/c mice. In anesthetized rats, regional ischemia was simulated by coronary artery occlusion and then coronary blood flow was restored. The peptide G was administered intravenously (i.v.) with a bolus after a period of regional ischemia in the dose range of 0.25-3.0 mg/kg. The sizes of MI and the activities of creatine kinase-MB (CK-MB) and lactate dehydrogenase (LDH) in blood plasma were estimated. The effect of administration of the optimal dose of G (1.0 mg/kg) on myocardial content of adenine nucleotides (AN), phosphocreatine (PCr), creatine (Cr) and lactate was studied. I.v. administration of G to rats at a dose of 1.0 mg/kg slightly affected hemodynamic parameters, but reduced MI size by 40% and decreased plasma LDH and CK-MB activity by the end of reperfusion compared to control. These effects were accompanied by a significant improvement in energy state of area at risk (AAR) – an increase in myocardial content of ATP, Σ AN, PCr and Σ Cr, and combined with a decrease in myocardial lactate level compared with the control. Toxicity of peptide G was studied with a single intraperitoneal injection of 0.5-3.0% solution of the peptide substance to mice. The absence of signs of intoxication and death of animals after G injection in the maximum possible dose did not allow determining the value of the average lethal dose. The results indicate therapeutic potential of the peptide G for preventing myocardial ischemia and reperfusion injury and feasibility for further study of its pharmacological properties and mechanisms of action.

Key words: modified galanin fragment; rat; myocardial ischemia and reperfusion; myocardial energy metabolism; toxicity

Funding. This work was supported by the Russian Foundation for Basic Research (grants #18-015-00008 and #18-015-00009).

Received: 13.02.2019, revised: 13.04.2019, accepted: 16.04.2019.