

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

©Коллектив авторов

ПРОТИВОИШЕМИЧЕСКАЯ И АНТИОКСИДАНТНАЯ АКТИВНОСТЬ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОГО АГОНИСТА РЕЦЕПТОРА ГАЛАНИНА GalR2 И КАРНОЗИНА В МОДЕЛЬНЫХ СИСТЕМАХ *IN VITRO* И *IN VIVO*

Л.И. Серебрякова, И.М. Студнева, О.М. Веселова, И.В. Доброхотов, Г.Г. Коновалова,
А.А. Тимошин, А.А. Абрамов, Д.В. Авдеев, М.В. Сидорова, В.З. Ланкин, О.И. Писаренко*

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

Антиоксидантные и противоишемические свойства фармакологического агониста рецепторов галанина WTLNSAGYLLGPβАН (Гал) и его С-концевого фрагмента дипептида карнозина (βАН) изучены на модели региональной ишемии и реперфузии сердца крысы *in vivo* в диапазоне доз 0,5-5,0 мг/кг и Cu²⁺-индуцированного свободнорадикального окисления липопротеинов низкой плотности (ЛНП) плазмы человека *in vitro* для концентраций пептидов 0,01 мМ и 0,1 мМ. Гал получен автоматическим твердофазным синтезом с использованием Fmoc-методологии; его структура охарактеризована с помощью ¹H-ЯМР-спектроскопии и MALDI-TOF масс-спектрометрии. Внутривенное введение крысам оптимальной дозы Гал (1мг/кг) после ишемии в большей степени, чем в случае карнозина, уменьшало размеры инфаркта миокарда и снижало активность креатинкиназы-МВ и лактатдегидрогеназы в плазме крови в конце реперфузии, улучшало метаболическое состояние реперфузируемого миокарда и уменьшало образование продуктов перекисного окисления при реперфузии. Гал уменьшал образование аддуктов гидроксильных радикалов в интерстиции зоны риска (ЗР) в достоверно большей степени, чем карнозин. Карнозин в дозе 1 мг/кг более эффективно увеличивал активность каталазы и глутатионпероксидазы в ЗР левого желудочка сердца крысы к концу реперфузии по сравнению с Гал. В модели Cu²⁺-инициированного окисления ЛНП плазмы крови человека 0,1 мМ карнозин продемонстрировал достоверно более выраженное уменьшение образования липидных радикалов по сравнению с Гал. Результаты показывают, что Гал можно рассматривать в качестве перспективного средства, снижающего повреждения сердца при реперфузии и окислительном стрессе.

Ключевые слова: галанин; карнозин; крыса; ишемия и реперфузия сердца; инфаркт миокарда; энергетическое состояние сердца; перекисное окисление липидов; антиоксидантные ферменты

DOI: 10.18097/PBMC20226803190

ВВЕДЕНИЕ

Изучение биохимических механизмов адаптации сердца к условиям недостаточного обеспечения кислородом и энергетическими субстратами является одной из актуальных проблем молекулярно-клеточной кардиологии. Такие состояния инициируются ишемией и реперфузией, атеросклерозом, сердечной недостаточностью, диабетом и другими заболеваниями. Основными причинами синдрома ишемического и реперфузионного (И/Р) повреждения сердца являются нарушение энергетического обеспечения клеток миокарда и образование активных форм кислорода (АФК), вызывающее окислительный стресс (ОС). В этих условиях природные лиганды рецепторов, сопряженных с G-белками, способны активировать внутриклеточные сигнальные каскады, запуская механизмы запрограммированного клеточного выживания [1]. К таким соединениям относится нейропептид галанин, состоящий у большинства видов животных из 29 аминокислотных остатков (а.о.) (у человека — 30 остатков), который участвует в регуляции жизненно важных процессов — запоминания, потребления пищи, засыпания, алкогольной зависимости, невропатической боли, выработки других гормонов, ионного гомеостаза и осмоса [2]. В периферических органах и тканях,

включая сердце, галанин активирует рецепторы GalR1, GalR2 и GalR3. Ранее мы показали, что экзогенные N-концевые фрагменты галанина (а.о. 2-11) и (а.о. 2-15) (WTLNSAGYLL-NH₂ и WTLNSAGYLLGPHA-OH соответственно), связываясь с рецептором GalR2, оказывают защитное действие на кардиомиоциты при И/Р повреждении. Оно обусловлено снижением образования супероксидных радикалов в митохондриях и уменьшением гибели клеток от апоптоза и некроза [3,4]. Впоследствии был синтезирован ряд пептидных аналогов фрагментов галанина (а.о. 2-11) и (а.о. 2-15) с сохранением фармакофорных а.о., ответственных за связывание с рецептором GalR2, которые также обладали кардиотропными свойствами [5]. Наиболее эффективной оказалась химерная молекула, представляющая последовательность галанина (а.о. 2-13), дополненную природным дипептидом карнозином WTLNSAGYLLGPβАН-OH (Гал) [6]. Гал улучшал параметры функции сердца крыс, интегрированность клеточных мембран и энергетическое состояние кардиомиоцитов, а также снижал образование АФК, продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) и увеличивал активность антиоксидантных ферментов в сердце при моделировании окислительного стресса *in vitro* и *in vivo* [7]. Содержащийся

в С-концевой части молекулы Гал карнозин вносит неопределённость в понимание природы защитных эффектов этого пептида. Эффективность карнозина была показана при различных патофизиологических состояниях (гипоксии/ишемии головного мозга, ишемии/реперфузии сердца, болезни Альцгеймера и др.); она обусловлена в первую очередь его прямым антиоксидантным действием, а также свойствами модулятора супероксиддисмутазы и рецепторов N-метил-D-аспартата, антигликирующего агента, хелатора ионов металлов и молекулярного шаперона [8-10].

Настоящая работа является продолжением изучения механизмов действия пептида Гал — химерного агониста рецепторов GalR2. Её цель заключалась в сравнении противоишемического и антиоксидантного эффектов Гал и карнозина при И/Р повреждении сердца крысы *in vivo* и в модельных системах *in vitro*. Для этого мы оценили влияние этих соединений на размеры инфаркта миокарда и повреждения мембран кардиомиоцитов, генерацию АФК, образование продуктов ПОЛ, активность Cu,Zn-супероксиддисмутазы (Cu,Zn-SOD), глутатионпероксидазы (ГП) и каталазы (КАТ), а также сравнили действие Гал и карнозина при моделировании Cu²⁺-индуцированного свободнорадикального окисления липопротеинов низкой плотности (ЛНП) человека *in vitro*.

МЕТОДИКА

Пептиды

Гал (WTLNSAGYLLGPβАН-ОН) получен ступенчатым твердофазным синтезом с использованием Fmoc-методологии [5]. Его очистка проведена методом высокоэффективной жидкостной хроматографии на обращённой фазе, структура охарактеризована с помощью ¹H-ЯМР-спектроскопии и MALDI-TOF масс-спектрометрии. Характеристики Гал приведены в таблице 1. L-Карнозин (βАН) (CAS 305-84-0) был приобретен у компании “Sigma-Aldrich” (США).

Животные

Для изучения влияния Гал и карнозина на сердце при ишемии и реперфузии использовали 56 самцов крыс Wistar (300-320 г). Животных содержали в виварии в условиях естественного освещения и свободного доступа к воде и корму.

Таблица 1. Характеристики пептида Гал

Последовательность	Мол. масса, г/моль	Выход*, %	Растворимость в воде, мг/мл	MALDI-TOF, m/z	ВЭЖХ**	
					R _t , мин	Чистота, %
WTLNSAGYLLGP-βАН-ОН	1499,67	46,3	>20	1499,76 [M + H] ⁺ , 1521,73 [M + Na] ⁺ , 1537,72 [M + K] ⁺	14,66	98,2

Примечание. R_t – Время удерживания. * – Выход приведён в расчёте на стартовую аминокислоту, присоединённую к полимерному носителю. ** – Условия ВЭЖХ: колонка Kromasil 100-5 C18 (4,6×250 мм, “AkzoNobel”, Швеция), буфер А – 0,05 М КН₂РО₄, рН 3,0, буфер Б – 70% ацетонитрил в буфере А, элюция со скоростью 1 мл/мин градиентом концентрации буфера Б в буфере А от 20% до 80% за 30 мин, детекция при 220 нм.

Модель региональной ишемии и реперфузии у крыс *in vivo*

Крыс наркотизировали 20% уретаном (1200 мг/кг веса внутривенно) и в условиях торакотомии осуществляли искусственную вентиляцию лёгких комнатным воздухом с помощью аппарата KTR-5 (“Hugo Sacks Elektronik”, Германия). Моделирование И/Р сердца было проведено, как указано в работе [6]. Запись на компьютер гемодинамических показателей в ходе опыта выполнена с помощью аналого-цифрового преобразователя USB 6210 (“National Instruments”, США) и программы в системе LabView 7 (“National Instruments”). Животные были рандомизированы в четыре группы по 8 крыс в каждой: исходное состояние (ИС), контроль (К), карнозин (Кар) и пептид Гал (Гал). После окончания препарирования животного следовал 30-минутный период стабилизации гемодинамических показателей (ИС). В контроле после ИС проводили 40-минутную окклюзию передней нисходящей коронарной артерии (ПНА), за которой следовала 60-минутная реперфузия. В группе Кар после периода региональной ишемии внутривенно (в/в) болюсом вводили карнозин в дозах 0,1 мг/кг, 1,0 мг/кг, 2,0 мг/кг или 5,0 мг/кг веса одновременно с началом реперфузии. Животным группы Гал одновременно с началом реперфузии в/в болюсом вводили Гал в дозах 0,25 мг/кг, 0,5 мг/кг, 1,0 мг/кг, 2,0 мг/кг или 3,0 мг/кг веса. Крысам контрольной группы в/в вводили такой же объём физиологического раствора (0,5 мл). В конце опыта для идентификации зоны риска (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 определения размеров ИМ.

Определение размеров 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 ИМ и ЗР определяли методом компьютерной планиметрии, используя программу ImageJ (“NIH”, США). После этого срезы взвешивали для определения массы ЛЖ.

В каждой группе рассчитывали отношения зона риска/вес левого желудочка (ЗР/ЛЖ) и инфаркт миокарда/зона риска (ИМ/ЗР) в процентах [11].

Оценка повреждения мембран кардиомиоцитов

Повреждение мембран кардиомиоцитов оценивали по увеличению активности лактатдегидрогеназы (ЛДГ) и МВ-фракции креатинкиназы (КК-МВ) 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 UV-1800 ("Shimadzu", Япония) при $\lambda=340$ нм, используя наборы фирмы "BioSystems" (Испания).

Определение содержания метаболитов в зоне риска сердца

В отдельной серии опытов оценивали влияние в/в введения оптимальной дозы пептидов (1,0 мг/кг) на метаболическое состояние ЗР. По окончании реперфузии ЗР быстро выделяли из ЛЖ и замораживали щипцами Волленбергера, охлаждёнными в жидком азоте. Замороженную ткань гомогенизировали в холодной 6% HClO_4 (10 мл/г ткани) в гомогенизаторе Ultra-Turrax T-25 ("IKA", 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 K_2CO_3 до pH 7,4. Осадок KClO_4 отделяли центрифугированием в тех же условиях. Безбелковые экстракты хранили при -70°C до определения метаболитов. Сухой вес гомогенизированной ткани определяли после высушивания образцов в течение суток при 110°C. Содержание АТР, АДФ, АМР, фосфокреатина (PCr), креатина (Cr) и лактата в тканевых экстрактах определяли энзиматическими методами [12], используя спектрофотометр UV-1800. Таким образом оценивали метаболическое состояние ЗР в конце реперфузии в контроле (в опытах с внутривенным введением физиологического раствора), в ИС (до окклюзии ПНА) и в пептидных группах. Для исследования метаболитов в каждой группе было использовано 8 животных.

Мониторирование образования АФК в ЗР сердце крысы с помощью спиновой ловушки

Для регистрации уровня короткоживущих кислородных радикалов в ЗР ЛЖ использовали метод микродиализа и спиновую ловушку 5,5-диметил-пирролин-N-оксид (ДМПО) [13]. В область региональной ишемии имплантировали микродиализное волокно (внешний диаметр 0,25 мм, проницаемое для веществ с Мв < 5 кДа), которое перфузировали раствором Рингера (pH 7,4 при 37°C), содержащим 100 мМ ДМПО, со скоростью 3 мкл/мин. Вытекающий диализат собирали последовательными 20-минутными фракциями в пластиковые пробирки, охлаждённые до 0°C. Образцы диализатов хранили в жидком азоте до регистрации спектров ЭПР. Спектры ЭПР образцов диализата, содержащего

спиновую ловушку ДМПО, регистрировали на спектрометре ЭПР X-диапазона типа E-109E ("Varian", США) при комнатной температуре. Амплитуда ВЧ модуляции магнитного поля составляла 0,1 мТл при частоте 100 кГц. Частота СВЧ-поля спектрометра — 9,14 ГГц, мощность — 10 мВт. Сканирование магнитного поля при записи сигналов осуществлялось с центром при $g=2,00$.

Определение активности антиоксидантных ферментов и содержания продуктов перекисного окисления липидов в зоне риска сердца крысы

Ткань ЗР сердца, замороженную в жидком азоте, гомогенизировали в 50 мМ Na-фосфатном буфере pH 7,4 (1:10 вес/объём) при помощи гомогенизатора Ultra-Turrax ("IKA") и центрифугировали на центрифуге Sigma 3-16 KL ("Sigma", США) при 1000 g и 4°C в течение 10 мин. В супернатанте определяли содержание вторичных продуктов ПОЛ (тиобарбитуратных кислотно-активных продуктов, ТБКАП) и активность Cu,Zn-СОД, ГП и КАТ. Активность Cu,Zn-СОД определяли по ингибированию восстановления синего нитротетразолия супероксидным радикалом, генерируемым в системе ксантин-ксантиноксидаза, определяя кинетику образования формазана при 560 нм [14]. Активность КАТ определяли по скорости расщепления H_2O_2 при 20°C в течение 1 мин по методу [15]. Активность ГП определяли спектрофотометрически в сопряжённой глутатион-глутатионредуктазной системе по окислению NADPH при $\lambda=340$ нм, используя гидропероксид трет-бутила в качестве субстрата [16]. Белки в супернатантах гомогената сердечной мышцы осаждали 10% трихлоруксусной кислотой (1:1). В центрифугате определяли содержание ТБКАП в реакции с 2-тиобарбитуровой кислотой, анализируя количество образовавшегося триметинового комплекса при $\lambda=532$ нм [17].

Оценка влияния пептидов на активность коммерческих антиоксидантных ферментов

Коммерческие препараты Cu,Zn-СОД, КАТ и ГП из бычьих эритроцитов и каталазы из бычьей печени производства "Sigma" растворяли в 50 мМ фосфатном буфере pH 7,4 до концентрации 250 мкг белка/мл. В раствор, содержащий каждый из ферментов, вводили Гал или карнозин в 50 мМ фосфатном буфере pH 7,4 до конечных концентраций 0,01 мМ и 0,1 мМ и инкубировали полученные смеси при 4°C в течение 24 ч. После окончания инкубации активность Cu,Zn-СОД, КАТ и ГП определяли согласно методам [14-16].

Исследование влияния пептидов на свободнорадикальное окисление ЛНП человека

Для препаративного выделения ЛНП плазмы крови доноров [7], содержащую 1 мг/мл ЭДТА, подвергали двукратному центрифугированию в градиенте плотности 1,019-1,063 г/см³ NaBr в течении 2 ч при скорости 42000 об/мин в угловом роторе 50 Ti при 4°C в рефрижераторной

ультрацентрифуге Optima XPN-80 ("Beckman Coulter", США) согласно методике [18]. Полученные ЛНП диализовали в изотоничном 50 мМ К,Na-фосфатном буфере pH 7,4 при 4°C в течение 16 ч. В образцах ЛНП при электрофорезе не было выявлено загрязнений другими фракциями липопротеинов или белками плазмы.

После диализа содержание белка в образцах ЛНП определяли по методу Лоури. Пробы разбавляли до 50 мкг белка/мл раствором, содержащим 0,154 М NaCl в 50 мМ К,Na-фосфатном буфере pH 7,4. В них добавляли Гал и карнозин в концентрациях 0,01 мМ и 0,1 мМ. Окисление ЛНП индуцировали при 37°C введением 30 мкМ $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, после чего через фиксированные интервалы времени измеряли накопление липогидропероксидов при $\lambda=233$ нм на спектрофотометре UV-2600. Степень ингибирования окисления ЛНП характеризовали продолжительностью периода индукции окисления (τ), за который принимали время достижения оптической плотности при $\lambda=233$ нм на кинетических кривых окисления ЛНП, равное 0,15 ($\Delta D_{233} = 0,15$) [18].

Статистика

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

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Действие Гал и карнозина при И/Р повреждении сердца у крыс *in vivo*

Гистохимический анализ срезов ЛЖ после реперфузии не выявил достоверных различий в размерах ЗР между контролем и пептидными группами Гал и Кар. Для исследованных групп величина отношения ЗР/ЛЖ в среднем составляла $40,8 \pm 0,9\%$. В контроле величина ИМ составляла $43,3 \pm 2,1\%$ (рис. 1а). Введение каждой из исследованных доз Гал приводило к уменьшению размеров ИМ. Оптимальная доза Гал 1,0 мг/кг снижала размер ИМ в среднем на 40% по сравнению с контролем ($p < 0,001$). В случае карнозина наибольшее снижение ИМ (на 16% по сравнению с контролем) было обнаружено для дозы 1,0 мг/кг ($p < 0,01$). Различия в эффективности ограничения ИМ между Гал и карнозином для дозы 1,0 мг/кг было статистически достоверным ($p = 0,044$).

Развитие ИМ в контроле сопровождалось увеличением активности маркеров некроза КК-МВ и ЛДГ в плазме к концу реперфузии, которое на порядок превышало эти показатели в ИС (рис. 1б,в). Введение Гал (1,0 мг/кг) снижало активность КК-МВ и ЛДГ по сравнению с контролем на 46% ($p < 0,005$) и 32% ($p < 0,05$) соответственно. Карнозин (1,0 мг/кг) достоверно уменьшал

активность КК-МВ в плазме в конце реперфузии в среднем на 28% по сравнению с контролем ($p < 0,05$) и недостоверно — активность ЛДГ (на 17%, $p = 0,079$). Статистически достоверное различие между пептидами было обнаружено для снижения активности КК-МВ ($p = 0,030$).

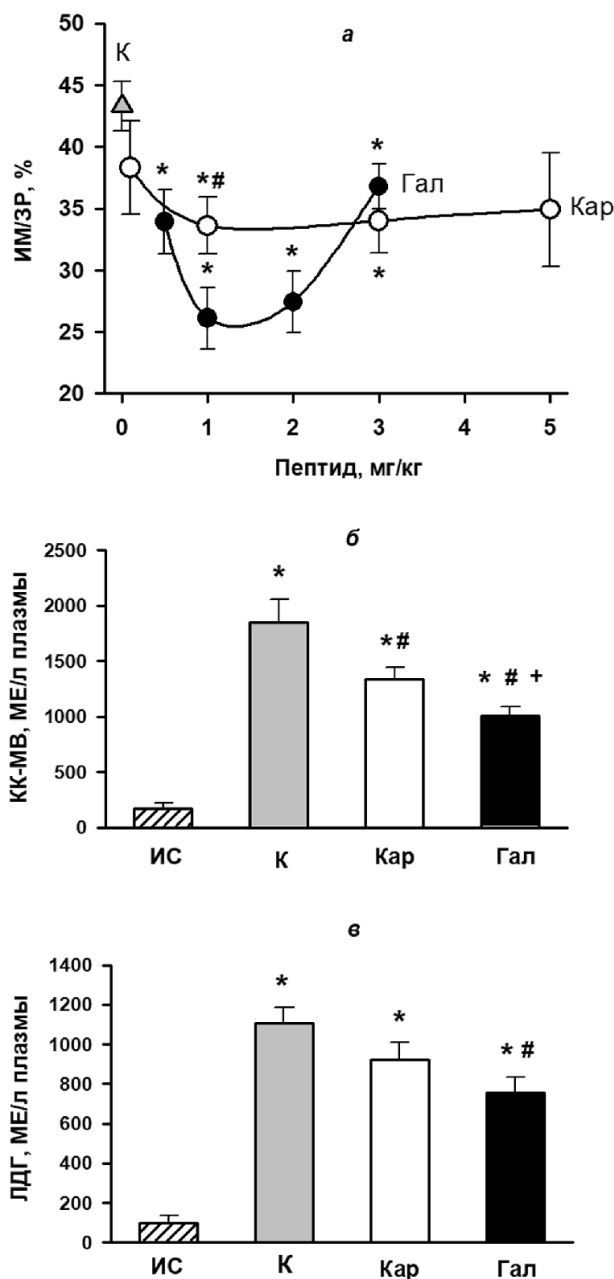


Рисунок 1. Влияние внутривенного введения карнозина (Кар) и Гал на показатели И/Р повреждения сердца у крыс *in vivo*. (а) Дозозависимое действие пептидов на размеры инфаркта миокарда (ИМ/ЗР, %). К – контроль, ИМ – инфаркт миокарда, ЗР – зона риска. Представлены данные для групп из 8 животных. Достоверно отличается ($p < 0,05$) от: * – К, # – Гал, + – Кар. Влияние оптимальных доз пептидов на активность креатинкиназы-МВ (б) и лактатдегидрогеназы (в) в плазме крови крыс в конце реперфузии. ИС – исходное состояние, К – контроль (введение физиологического раствора), Кар (1 мг/кг), Гал (1 мг/кг). Представлены данные для групп из 8 животных. Достоверно отличается ($p < 0,05$) от: * – ИС, # – К.

ЗАЩИТНЫЕ ЭФФЕКТЫ АГОНИСТА РЕЦЕПТОРА GalR2 И КАРНОЗИНА

Сопоставление влияния оптимальных доз Гал и карнозина на показатели метаболического состояния ЗР в конце реперфузии на этой модели показано на рисунке 2. И/Р повреждение вызывало значительное уменьшение содержания макроэргических фосфатов и увеличение содержания лактата в ЗР сердца по сравнению с исходными значениями. Введение Гал увеличивало содержание АТР (на 40% по сравнению с контролем, $p=0,012$) и практически не влияло на уровни ADP и AMP. Результатом этого было достоверное увеличение содержания общего фонда адениннуклеотидов ΣAN (на 52% по сравнению с контролем, $p<0,001$). Одновременно отмечено незначительное увеличение восстановления PCr ($p=0,056$) и содержания Cr. Под влиянием Гал общий креатин ($\Sigma Cr = PCr + Cr$) был сохранен в ЗР в большей степени, чем в контроле (в среднем на 28%, $p<0,01$). Эти изменения в энергетическом состоянии ЗР сопровождалось снижением накопления лактата в 3 раза по сравнению с контролем ($p<0,001$). Под действием карнозина наблюдалась тенденция к увеличению содержания АТР и ADP в ЗР по сравнению со значениями в контроле, уровень AMP не изменялся. Это приводило к достоверному увеличению ΣAN ($p=0,024$). Карнозин не оказывал значимого влияния на содержание компонентов системы PCr-Cr по сравнению с контролем. Введение карнозина снижало содержание лактата в ЗР по сравнению с контролем ($p<0,001$). В целом эффективность воздействия обоих пептидов

на метаболические показатели реперфузированной области миокарда была близкой; статистически достоверное различие между пептидными группами наблюдалось только для ΣCr (рис. 2д). Под действием Гал ΣCr был сохранён на 82% от предischemического значения, а при введении карнозина — на 68% ($p<0,01$).

Влияние Гал и карнозина на образование АФК в зоне риска сердца крысы

Влияние оптимальных доз Гал и карнозина на образование АФК в ЗР сердца крысы было изучено с помощью ловушки радикалов ДМПО. Это соединение способно эффективно взаимодействовать как с супероксидными, так и с гидроксильными радикалами с образованием относительно стабильных спиновых аддуктов, регистрируемых методом ЭПР. Спектры ЭПР образцов диализата состояли из четырёх узких эквидистантных линий, соотношение амплитуд которых составляло 1:2:2:1, что характерно для парамагнитного аддукта ДМПО-ОН, образующегося в результате взаимодействия ДМПО и гидроксида [19]. На рисунке 3 представлены изменения в содержании аддукта ДМПО-ОН в образцах диализата в ходе опыта. Видно, что в контроле после 40-минутной окклюзии ПНА содержание ДМПО-ОН в диализате увеличивалось, что свидетельствовало об увеличении уровня АФК в интерстиции ЗР. Это могло быть связано с существенным возрастанием скорости генерации АФК в дыхательной цепи митохондрий при восстановлении кровотока в ЗР. Введение Гал перед реперфузией достоверно

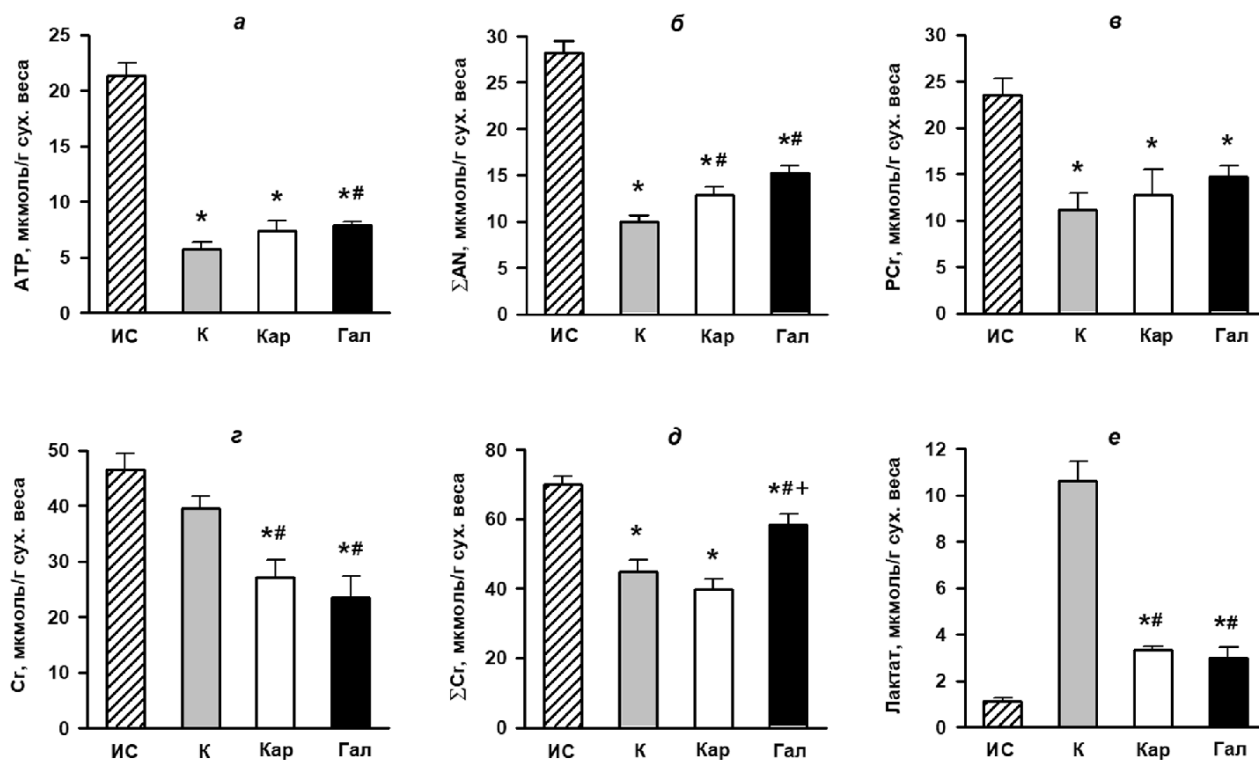


Рисунок 2. Содержание макроэргических фосфатов (а, в), пула адениннуклеотидов (ΣAN) (б), креатина (Cr) (г), общего креатина (ΣCr) (д) и лактата (е) в зоне риска сердца крыс в исследуемых группах. ИС – исходное состояние, К – контроль (введение физиологического раствора), Кар – карнозин (1 мг/кг), Гал – пептид Гал (1 мг/кг). $\Sigma AN = ATP + ADP + AMP$. $\Sigma Cr = PCr + Cr$. Представлены данные для групп из 8 животных. Достоверно отличается ($p<0,05$) от: * – ИС, # – К, + – Кар.

снижало содержание ДМПО-ОН по сравнению с контролем. Эти данные указывают на уменьшение образования АФК в реперфузированной области сердца под действием этого пептида. Под действием карнозина достоверного снижения аддукта ДМПО-ОН в диализатах ЗР по сравнению с контролем не происходило. Начиная со 120 мин опыта и до окончания реперфузии, различия в содержании ДМПО-ОН в образцах диализата между пептидными группами были достоверными ($p < 0,05$).

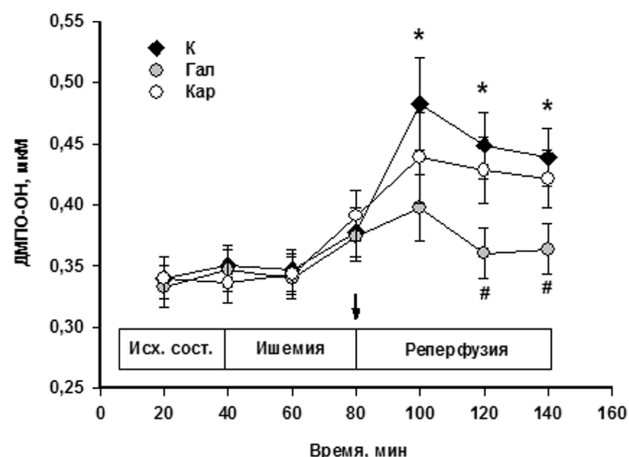


Рисунок 3. Влияние Гал и карнозина на концентрацию аддукта ДМПО-ОН в интерстиции зоны риска сердца крысы в ходе опыта. К – контроль (введение физиологического раствора), Гал (1 мг/кг), Кар (1 мг/кг). Представлены данные для групп из 8 животных. * – Достоверно отличается ($p < 0,01$) от * – К, # – Гал. Стрелкой показано внутривенное введение пептидов.

Влияние Гал и карнозина на содержание ТБКАП и активность антиоксидантных ферментов в ЗР сердца крысы

Содержание ТБКАП в ЗР контрольной группы в конце реперфузии в два раза превышало уровень этого маркера ПОЛ в исходном состоянии ($p = 0,012$). Введение Гал и карнозина достоверно снижало образование ТБКАП в ЗР к концу реперфузии по сравнению с контролем. Под действием Гал этот показатель снижался до значений почти вдвое более низких, чем при введении карнозина ($p < 0,005$). В контроле активности Cu,Zn-СОД, каталазы и ГП в ЗР не отличались от значений в исходном состоянии (рис. 4). Введение Гал увеличивало активность Cu,Zn-СОД ($p = 0,043$), но не оказывало достоверного влияния на активность КАТ и ГП в ЗР к окончанию реперфузии по сравнению с контролем. Под действием карнозина происходило увеличение активности Cu,Zn-СОД, КАТ и ГП в 1,3, 1,7 и 1,4 раза соответственно по сравнению со значениями в контроле ($p < 0,02-0,001$).

Влияние пептидов на активность Cu,Zn-СОД, КАТ и ГП при реперфузионном повреждении сердца могло быть связано с их непосредственным воздействием на ферменты. Такая ситуация была смоделирована инкубацией Гал и карнозина с коммерческими ферментами Cu,Zn-СОД, ГП и КАТ в системах *in vitro*. При выборе концентраций пептидов в инкубационной среде были учтены доза и объем циркулирующей крови в крысе средней массы 300 г. В соответствии с этим была использована концентрация пептидов, близкая к физиологической (0,01 мМ) и на порядок более высокая (табл. 2).

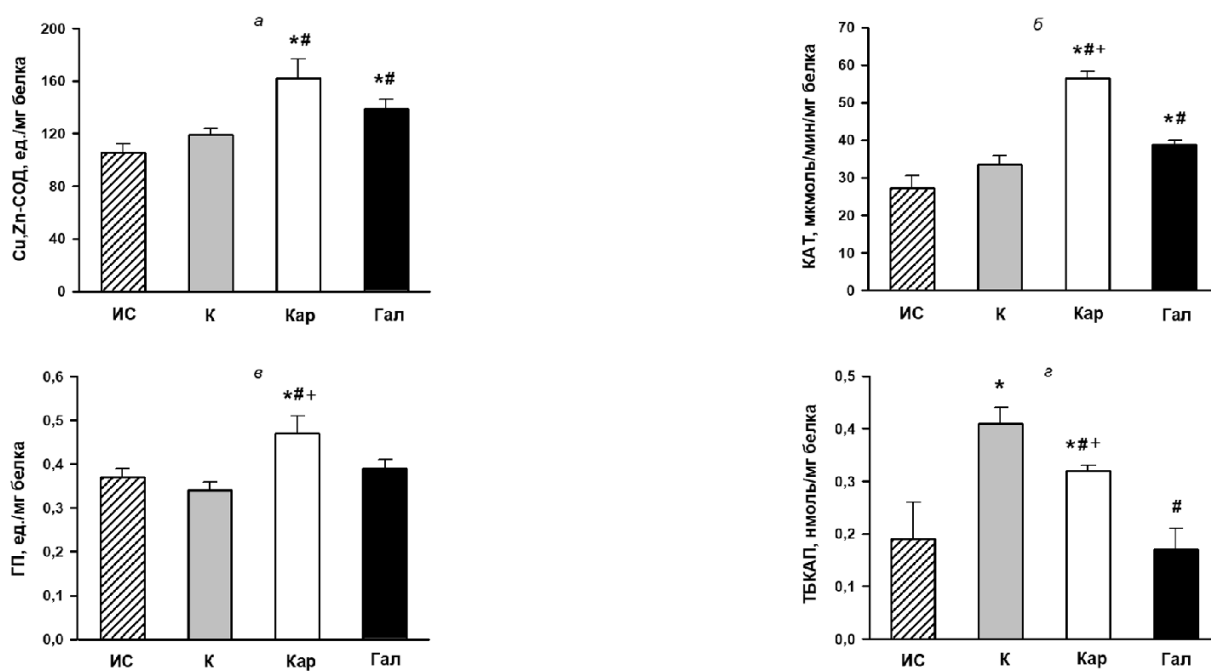


Рисунок 4. Активность Cu,Zn-супероксиддисмутазы (Cu,Zn-СОД) (а), каталазы (КАТ) (б), глутатионпероксидазы (ГП) (в) и содержание тиобарбитуратных кислотно-активных продуктов (ТБКАП) (г) в зоне риска сердца крысы. ИС – исходное состояние, К – контроль (введение физиологического раствора), Кар – в/в введение карнозина в дозе 1 мг/кг, Гал – в/в введение Гал в дозе 1 мг/кг. Представлены данные для групп из 8 животных. Достоверно отличается ($p < 0,05$) от: * – ИС, # – К, + – Кар.

ЗАЩИТНЫЕ ЭФФЕКТЫ АГОНИСТА РЕЦЕПТОРА GalR2 И КАРНОЗИНА

Таблица 2. Влияние галанина и карнозина на активность коммерческих препаратов антиоксидантных ферментов *in vitro*

	Cu,Zn-COD, ед./мл	КАТ, ед./мл	ГП, ед./мл
Контроль	145,30±3,19	462,84±3,07	12,73±0,45
Карнозин, 0,01 мМ	199,32±1,19*	439,25±1,02*	13,35±0,27
Карнозин, 0,1 мМ	202,21±4,01*#	446,77±4,70*	12,99±0,28
Гал, 0,01 мМ	193,73±3,72*	443,12±1,77*	13,82±0,34
Гал, 0,1 мМ	180,23±3,36*	438,36±2,68*	13,12±0,10

Примечание. Представлены данные для серий из 3 опытов. Достоверное отличие ($p<0,05$) от: * – контроля, # – Гал.

Из данных, представленных в таблице 2, видно, что варьирование концентраций пептидов в инкубационной среде мало влияло на активность антиоксидантных ферментов. Оба пептида в концентрации 0,01 мМ и 0,1 мМ достоверно увеличивали активность Cu,Zn-COD в среднем на 37% и 28% соответственно по сравнению со значениями в контроле. Инкубация с карнозином или Гал в концентрации 0,01 мМ и 0,1 мМ вызывала незначительное, но достоверное снижение активности КАТ (в среднем на 5% для обоих пептидов) по сравнению с контролем. Обе концентрации Гал и карнозина не оказывали влияния на активность ГП. Эти данные показывают, что изменения активности коммерческих антиоксидантных ферментов при инкубации с карнозином и Гал имеют разнонаправленный характер, не согласующийся с данными опытов *in vivo* (рис. 4).

Одной из причин возрастания активности антиоксидантных ферментов в ЗР сердца крысы под действием пептидов могло быть увеличение экспрессии их генов. В пользу этого предположения свидетельствуют результаты работы [20], в которой продемонстрировано снижение размеров инфаркта миокарда у мышей в результате введения галанина, которое сопровождалось увеличением экспрессии мРНК Cu,Zn-COD в кардиомиоцитах. Способность карнозина увеличивать антиоксидантную ёмкость клетки посредством увеличения экспрессии ключевых антиоксидантных ферментов была отмечена на различных экспериментальных объектах [21, 22]. Известно также, что многие пептиды обладают способностью перехватывать АФК и ингибировать ПОЛ [23]. Эти свойства хорошо документированы для карнозина [8-10]. В ряде независимых исследований, включающих И/Р повреждение сердца, было продемонстрировано уменьшение образования АФК и эффективное подавление накопления продуктов ПОЛ (малонового диальдегида, пероксильных радикалов и цитотоксичных ненасыщенных альдегидов 4-гидроксиноненала и акролеина) под действием карнозина [24-27]. Данные о прямом антиоксидантном действии Гал в литературе отсутствуют. Мы полагаем, что механизмы действия этого пептида при состояниях, характеризующихся повышенным уровнем окислительного стресса (синдром И/Р повреждения, диабет, метаболический синдром, нейродегенеративные заболевания), представляются важной задачей будущих исследований.

Влияние пептидов на свободнорадикальное окисление ЛНП плазмы крови человека

На этом этапе был использован разработанный нами ранее метод исследования ингибиторной активности соединений на модели Cu^{2+} -инициированного окисления природных изолированных ЛНП плазмы крови здоровых доноров [18]. Результаты проведённых кинетических экспериментов представлены на рисунке 5. При использовании данного метода продолжительность периодов индукции окисления ЛНП τ зависела исключительно от антиоксидантной способности внесённых в среду окисления экзогенных пептидов. Вычисленные при анализе кинетических кривых окисления значения τ для разных концентраций пептидов сопоставлены в таблице 3. Из них следует, что 0,01 мМ Гал (в отличие от 0,01 мМ карнозина) подавлял свободнорадикальное окисление ЛНП. Увеличение концентрации пептидов в инкубационной среде достоверно увеличивало их ингибирующую активность; 0,1 мМ карнозин в достоверно большей степени ингибировал окисление ЛНП, чем 0,1 мМ Гал ($p<0,001$). В целом, способность ингибировать свободнорадикальное окисление липидов плазмы человека у этих соединений была сопоставимой.

Сравнение защитного действия Гал и карнозина

В настоящей работе противоишемическая и антиоксидантная активность фармакологического агониста рецепторов галанина GalR2 Гал и дипептида карнозина была изучена на моделях И/Р повреждения сердца у крыс *in vivo* и свободнорадикального окисления ЛНП плазмы крови человека *in vitro*. Внутривенное болюсное введение этих пептидов крысам в начале реперфузии инициировало противоишемическую защиту повреждённого

Таблица 3. Продолжительность периодов индукции (τ , мин) свободнорадикального окисления ЛНП в присутствии различных концентраций карнозина и Гал

Группы	Концентрация пептидов	
	0,01 мМ	0,1 мМ
Контроль	20±0,2	
Карнозин	20±0,1	34±0,3*#
Гал	23±0,2*	30±0,1*#

Примечание. Представлены данные для серий из 3 опытов. Достоверное отличие ($p<0,05$) от: * – контроля, # – 0,01 мМ карнозина и 0,01 мМ Гал, + – 0,1 мМ Гал.

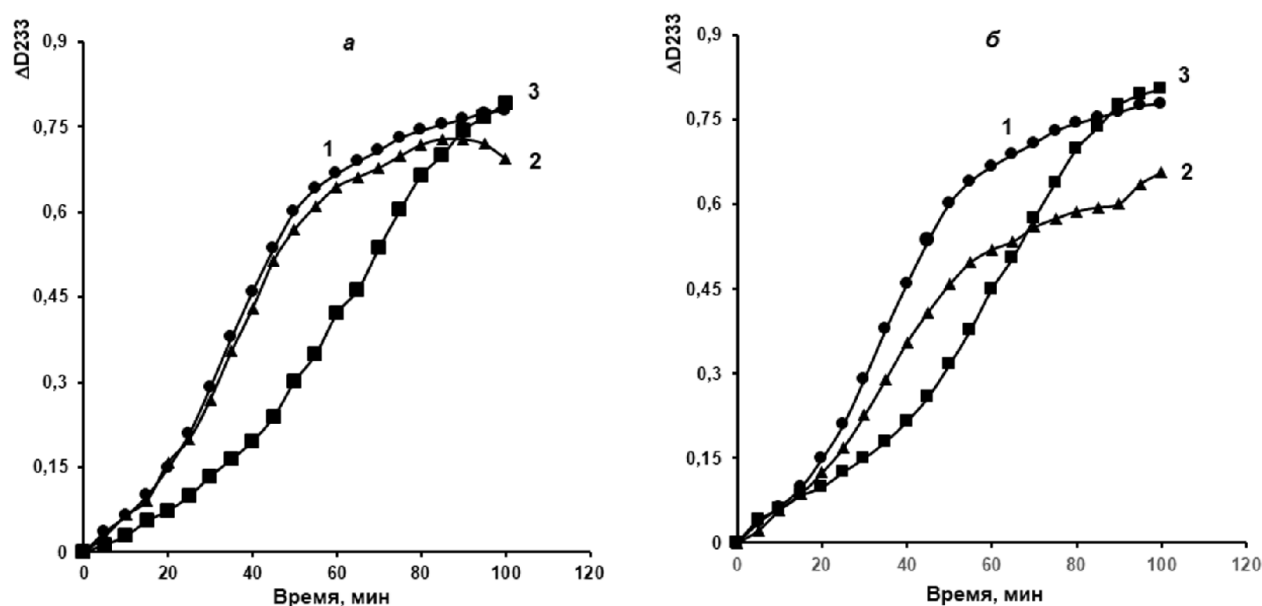


Рисунок 5. Влияние карнозина (а) и Гал (б) на кинетику Cu^{2+} -инициированного свободнорадикального окисления ЛНП. 1 – а и б контроль (без добавления пептидов в инкубационную среду); 2 – с добавлением в инкубационную среду карнозина (а) и Гал (б) в концентрации 0,01 мМ; 3 – с добавлением в инкубационную среду карнозина (а) и Гал (б) в концентрации 0,1 мМ.

Таблица 4. Влияние Гал и карнозина на показатели повреждения ишемизированного миокарда и окислительного стресса

Показатель	Гал	Карнозин
Ограничение размеров инфаркта миокарда	++	+
Снижение активности КК-МВ в плазме крови	++	+
Снижение активности ЛДГ в плазме крови	+	—
Улучшение энергетического состояния реперфузированного миокарда	++	+
Уменьшение образования аддуктов ДМПО-ОН в ЗР	++	+
Увеличение активности Cu,Zn -СОД в ЗР	+	+
Увеличение активности КАТ в ЗР	+	++
Увеличение активности ГП в ЗР	—	++
Снижение образования продуктов ПОЛ ТБКАП в ЗР	++	+
Ингибирование свободнорадикального окисления ЛПН плазмы крови	+	++

Примечание. Обобщены данные, представленные на рисунках 1-5. Достоверное отличие ($p < 0,05$) от: + – контроля; ++ – пептида сравнения; — – отсутствие эффекта.

миокарда. Она проявлялась в ограничении размеров ИМ, уменьшении повреждения мембран кардиомиоцитов, которое оценивали по снижению активности КК-МВ и ЛДГ в плазме крови, и улучшении метаболического состояния ЗР в конце реперфузии. На этой же модели были выявлены антиоксидантные свойства обоих пептидов. Они заключались в снижении образования аддукта гидроксильных радикалов ДМПО-ОН в интерстиции ЗР ЛЖ при возобновлении кровотока, увеличении активности Cu,Zn -СОД, КАТ и ГП в ЗР, которая сопровождалась уменьшением образования ТБКАП в реперфузированной области сердца. Способность Гал и карнозина ингибировать свободнорадикальное окисление липидов была продемонстрирована на модели Cu^{2+} -инициированного окисления природных ЛНП плазмы крови человека. Эффективность влияния пептидов на показатели повреждения миокарда и окислительного стресса сопоставлена в таблице 4.

Обращает на себя внимание, что Гал более эффективно, чем карнозин ограничивал размеры ИМ. Этот эффект сопровождался уменьшением активности обоих маркеров некроза (КК-МВ и ЛДГ) в плазме крови и достоверно более выраженным улучшением метаболизма ЗР в конце реперфузии по сравнению с этими показателями для карнозина. Возможность активации различных путей передачи сигнала при связывании N-концевых фрагментов галанина с рецептором GalR2 и её последствия для повреждённых кардиомиоцитов обсуждалась нами ранее в работах [7, 28]. Сопряжение GalR2 с G-белками различных типов (Gi/o , Gq/11 и G12/13) может стимулировать захват и окисление глюкозы кардиомиоцитами [29, 30], ингибировать проапоптозные белки BAD/BAX и снижать активности каспазы-3 и каспазы-9 [31, 32], блокировать открытие митохондриальных пор временной проницаемости (mPTP) и, таким образом, способствовать выживанию и подвижности клеток [33].

Наряду с этим пептидные агонисты галанина, включая Гал, способны усиливать механизмы антиоксидантной защиты при И/Р повреждении сердца. В настоящей работе это подтверждено снижением образования АФК в диализатах ЗР при реперфузии, обнаруженным с помощью метода ЭПР, увеличением активности Cu,Zn-СОД и КАТ в реперфузированной области сердца и заметным снижением содержания продуктов ПОЛ в ЗР в конце реперфузии. Для Гал нами также была выявлена способность ингибировать свободнорадикальное окисление ЛНП плазмы крови человека, не связанная с активацией GalR2 рецепторов. Карнозин в соответствии с ранее полученными результатами [25-27] продемонстрировал достоверно более выраженную активацию антиоксидантных ферментов КАТ и ГП в ЗР и уменьшение образования липидных радикалов при использовании высокой концентрации (0,1 мМ) в модели Cu²⁺-инициированного окисления ЛНП плазмы крови человека.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Фармакологический агонист рецепторов галанина пептид Гал (WTLNSAGYLLGPВАН-ОН) и его С-концевой фрагмент — дипептид карнозин (ВАН) — обнаруживают сходные метаболические и антиоксидантные эффекты на моделях региональной ишемии и реперфузии сердца крысы *in vivo* и свободнорадикального окисления ЛНП плазмы крови человека, инициируемого Cu²⁺. При использовании близких доз Гал более эффективно, чем карнозин, снижает некротическую гибель кардиомиоцитов в зоне окклюзии коронарной артерии при реперфузии и выход в кровоток маркера некроза КК-МВ. Как известно, применение фармакологических агентов, способных посткондиционировать ишемизированное сердце, в период ранней реперфузии признано полезным дополнением к существующим методам защиты от ИМ и хорошо документировано в эксперименте. К настоящему времени в клинических исследованиях изучено действие незначительного числа таких соединений. Результаты настоящей работы предполагают возможность использования Гал в качестве средства адъювантной терапии для снижения реперфузионных повреждений миокарда. В дальнейшем представляется важным изучение молекулярных механизмов и сигнальных молекул, активация которых фармакологическими агонистами рецепторов галанина способна воспроизводить эффекты посткондиционирования.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского Фонда Фундаментальных Исследований (гранты № 18-015-00008 и № 18-015-00009), Российского Научного Фонда (грант № 22-15-00013) и Министерства здравоохранения РФ (рег. № НИОКТР 121031700143-1).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Опыты выполнены в соответствии с “Международными рекомендациями по проведению биомедицинских исследований с использованием животных”, принятым Международным советом медицинских научных обществ в 1985 г (Женева).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

1. West C., Hanyaloglu A.C. (2015) Spatial programming of G protein-coupled receptor activity: decoding signaling in health and disease. *Molecular Endocrinol.*, **29**(8), 1095-1106. DOI: 10.1210/ME.2015-1065
2. Tatemoto K., Rokaeus A., Jornvall H., McDonald T.J., Mutt V. (1983) Galanin — a novel biologically active peptide from porcine intestine. *FEBS Lett.*, **164**, 124-128. DOI: 10.1016/0014-5793(83)80033-7
3. 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) Myocardial protection from ischemia/reperfusion injury by exogenous galanin fragment. *Oncotarget*, **8**(60), 21241-21252. DOI: 10.18632/oncotarget.15071
4. Pisarenko O., Timotin A., Sidorova M., Studneva I., Shulzhenko V., Palkeeva M., Serebryakova L., Molokoedov A., Veselova O., Cinato M., Boal F., Tronchere H., Kunduzova O. (2017) Cardioprotective properties of N-terminal galanin fragment (2-15) in experimental ischemia/reperfusion injury. *Oncotarget*, **8**(60), 101659-101671. DOI: 10.18632/oncotarget.21503
5. 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. (2018) Тетрадекапептиды, улучшающие восстановительную функцию сердечно-сосудистой системы при ишемии. Патент № 2648846, 28.03.2018. Москва, Федеральная служба по интеллектуальной собственности, патентам и товарным знакам. [Azmuco A.A., Veselova O.M., Molokoedov A.S., Ovchinnikov M.V., Palkeeva M.E., Pisarenko O.I., Serebriakova L.I., Sidorova M.V., Studneva I.M. (2018) Tetradecapeptides that improve the recovery function of the cardiovascular system during ischemia. Patent No. 2648846, 28.03.2018. Moscow, Federal Service for Intellectual Property].
6. Palkeeva M., Studneva I., Molokoedov A., Serebryakova L., Veselova O., Ovchinnikov M., Sidorova M., Pisarenko O. (2019) Galanin/GalR1-3 system: a promising therapeutic target for myocardial ischemia/reperfusion injury. *Biomed. Pharmacother.*, **109**, 1556-1562. DOI: 10.1016/j.biopha.2018.09
7. Pisarenko O.I., Studneva I.M., Serebryakova L.I., Timoshin A.A., Konovalova G.G., Lankin V.Z., Tihaze A.K., Veselova O.M., Dobrokhoto I.V., Lyubimov R.O., Sidorova M.V., Palkeeva M.E., Molokoedov A.S. (2021) Antioxidant properties of galanin and its N-terminal fragments in *in vitro* and *in vivo* oxidative stress modeling. *Biochemistry (Moscow)*, **86**, 496-505. DOI: 10.1134/S0006297921040106

8. Bellia F, Vecchio G, Cuzzocrea S, Calabrese V, Rizzarelli E. (2011) Neuroprotective features of carnosine in oxidative driven diseases. *Mol. Aspects Med.*, **32**(4-6), 258-266. DOI: 10.1016/j.mam.2011.10.009
9. Boldyrev A.A., Aldini G, Derave W. (2013) Physiology and pathophysiology of carnosine. *Physiol. Rev.*, **93**, 1803-1845. DOI: 10.1152/physrev.00039.2012
10. Johnson P, Hammer J.L. (1992) Histidine dipeptide levels in ageing and hypertensive rat skeletal and cardiac muscles. *Comp. Biochem. Physiol. B*, **103**(4), 981-984. DOI: 10.1016/0305-0491(92)90226-h
11. Kitakaze M., Takashima S., Funaya H., Minamino T., Node K., Shinozaki Y., Mori H., Hori M. (1997) Temporary acidosis during reperfusion limits myocardial infarct size in dogs. *Am. J. Physiol.*, **272**, H2071-H2078. DOI: /10.1152/ajpheart.1997.272.5.H2071
12. Bergmeyer H.U. (1974) *Methods of enzymatic analysis*. New York: Academic Press, pp. 1464-1467, 1772-1776, 1777-17781, 2127-2131.
13. Timoshin A.A., Tskitishvili O.V., Serebryakova L.I., Kuzmin A.I., Medvedev O.S., Ruuge E.K. (1994) Microdialysis study of ischemia-induced hydroxyl radicals in the canine heart. *Experientia*, **50**, 677-679. DOI: 10.1007/BF01952872
14. Beauchamp C., Fridovich I. (1971) Superoxide dismutase: improved assays and assay applicable to acrylamide gels. *Analyt. Biochem.*, **44**, 276-287. DOI: 10.1016/0003-2697(71)90370-8
15. Aebi H. (1984) Catalase *in vitro*. *Methods Enzymol.*, **105**, 121-126. DOI: 10.1016/s0076-6879(84)05016-3.
16. Lankin V.Z., Konovalova G.G., Tikhaze A.K., Shumaev K.V., Belova E.M., Grechnikova M.A., Viigimaa M. (2016) Aldehyde inhibition of antioxidant enzymes in the blood of diabetic patients. *J. Diabetes*, **8**(3), 398-404. DOI: 10.1111/1753-0407.12309
17. Draper H.H., Hadley M. (1990) Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods Enzymol.*, **186**, 421-431. DOI: 10.1016/0076-6879(90)86135-i.
18. Ланкин В.З., Кандалинцева Н.В., Коновалова Г.Г., Тихазе А.К., Хольшин С.В., Ягунов С.Е., Одинокова О.А. (2017) Способ экспресс-скрининга потенциальных антиоксидантов с использованием кинетической модели медь-инициированного свободнорадикального окисления липопротеидов низкой плотности плазмы крови человека. Патент на изобретение RU 2629398 от 29.08.2017; Москва, Федеральная служба по интеллектуальной собственности, патентам и товарным знакам [Lankin V.Z., Kandalintseva N.V., Konovalova G.G., Tikhaze A.K., Kholshin S.V., Yagunov S.E., Odinokova O.A. (2017) A method for rapid screening of potential antioxidants using a kinetic model of copper-induced free radical oxidation of low-density lipoproteins in human plasma. Invention Patent RU 2629398, 29.08.17; Moscow, Federal Service for Intellectual Property.]
19. Britigan B.E., Cohen M.S., Rosen G.M. (1987) Detection of the production of oxygen-centered free radicals by human neutrophils using spin trapping techniques: A critical perspective. *J. Leukocyte Biol.*, **41**, 349-362. DOI: 10.1002/jlb.41.4.349
20. Timotin A., Cinato M., Kramar S., Loy H., Merabishvili G., Boal F., Tronchere H., Kunduzova O. (2019) Galanin is a checkpoint regulator of mitochondrial biogenesis coordinating a pro-survival phenotype in post-infarct myocardial remodeling. https://papers.ssrn.com/sol3/papers.cfm?abstract_id=3424189
21. Fresta C.G., Fidilio A., Lazzarino G., Musso N., Grasso M., Merlo S., Amorini A.M., Bucolo C., Tavazzi B., Lazzarino G., Lunte S.M., Caraci F., Caruso G. (2020) Modulation of pro-oxidant and pro-inflammatory activities of M1 macrophages by the natural dipeptide carnosine. *Int. J. Mol. Sci.*, **21**, 776. DOI: 10.3390/ijms21030776
22. Prokopieva V.D., Yarygina E.G., Bokhan N.A., Ivanova S.A. (2016) Use of carnosine for oxidative stress reduction in different pathologies. *Oxid. Med. Cell. Longev.*, **2016**, 2939087. DOI: 10.1155/2016/2939087
23. Jakubczyk A., Karas M., Rybczynska-Tkacz K., Zielinska E., Zielinski D. (2020) Current trends of bioactive peptides — new sources and therapeutic effect. *Foods*, **9**, 846. DOI: 10.3390/foods9070846
24. Kohen R., Yamamoto Y., Cundy K.C., Ames B.N. (1988) Antioxidant activity of carnosine, homocarnosine, and anserine present in muscle and brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 3175-3179. DOI: 10.1073/pnas.85.9.3175
25. Zhou S., Decker E.A. (1999) Ability of carnosine and other skeletal muscle components to quench unsaturated aldehydic lipid oxidation products. *J. Agric. Food Chem.*, **47**, 51-55. DOI: 10.1021/jf980780j
26. Zhao J., Posa D.K., Kumar V., Hoetker D., Kumar A., Ganesan S., Riggs D.W., Bhatnagar A., Wempe M.F., Baba S.P. (2019) Carnosine protects cardiac myocytes against lipid peroxidation products. *Amino Acids*, **51**(1), 123-138. DOI: 10.1007/s00726-018-2676-6.
27. Zhao J., Conklin D.J., Guo Y., Zhang X., Obal D., Guo L., Jagatheesan G., Katragadda KHe., L., Yin X., Prodhan A.I., Shah J., Hoetker D., Kumar A., Kumar V., Wempe M.F., Bhatnagar A., Baba S.P. (2020) Cardiospecific overexpression of ATPGD1 (carnosine synthase) increases histidine dipeptide levels and prevents myocardial ischemia reperfusion injury. *J. Am. Heart Assoc.*, **9**(12), e015222. DOI: 10.1161/JAHA.119.015222
28. Pisarenko O.I., Studneva I.M., Veselova O.M. (2021) Modified N-terminal fragments of galanin: Cardioprotective properties and mechanisms of action. *Biochemistry (Moscow)*, **86**(10), 1342-1351. DOI: 10.1134/S000629792110014X
29. Fang P., Shib M., Guo L., He B., Wang Q., Yu M., Bo P., Zhang Zh. (2014) Effect of endogenous galanin on glucose transporter 4 expression in cardiac muscle of type 2 diabetic rats. *Peptides*, **62**, 159-163. DOI: 10.1016/j.peptides.2014.10.001.
30. Jay M.A., Ren J. (2007) Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) in metabolic syndrome and type 2 diabetes mellitus. *Curr. Diab. Rev.*, **3**, 33-39. DOI: 10.2174/157339907779802067.
31. Lang R., Gundlach A.L., Kofler B. (2007) The galanin peptide family: receptor pharmacology, pleiotropic biological actions, and implications in health and disease. *Pharmacol. Ther.*, **115**(2), 177-207. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2007.05.009
32. Krijnen P.A., Nijmeijer R., Meijer C.J., Visser C.A., Hack C.E., Niessen H.W. (2002) Apoptosis in myocardial ischaemia and infarction. *J. Clin. Pathol.*, **55**, 801-811. DOI: 10.1136/jcp.55.11.801.
33. Hausenloy D.J., Yellon D.M. (2013) Myocardial ischemia-reperfusion injury: A neglected therapeutic target. *J. Clin. Invest.*, **123**, 92-100. DOI: 10.1172/JCI62874.

Поступила в редакцию: 31. 05. 2022.
После доработки: 02. 06. 2022.
Принята к печати: 03. 06. 2022.

THE ANTI-ISCHEMIC AND ANTIOXIDANT ACTIVITY OF THE PHARMACOLOGICAL AGONIST OF GALANIN RECEPTOR GalR2 AND CARNOSINE IN *IN VITRO* AND *IN VIVO* MODEL SYSTEMS

*L.I. Serebryakova, I.M. Studneva, O.M. Veselova, I.V. Dobrokhotov, G.G. Konovalova, A.A. Timoshin, A.A. Abramov, D.V. Avdeev, M.V. Sidorova, V.Z. Lankin, O.I. Pisarenko**

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

Antioxidant and anti-ischemic properties of the pharmacological agonist of galanin receptor GalR2 WTLNSAGYLLGPBAH (Gal) and its C-terminal fragment, dipeptide carnosine (BAH), were studied in the model of regional ischemia and reperfusion of the rat heart *in vivo* in the dose range of 0.5-5.0 mg/kg and Cu²⁺-induced free radical oxidation of low density lipoproteins (LDL) of human plasma *in vitro* for peptide concentrations of 0.01 mM and 0.1 mM. Gal was obtained by automatic solid phase synthesis using the Fmoc methodology; its structure was characterized by ¹H-NMR spectroscopy and MALDI-TOF mass spectrometry. Intravenous administration of the optimal dose of Gal (1 mg/kg) to rats after ischemia was more effective than carnosine in reducing of the myocardial infarct size and the activity of creatine kinase-MB and lactate dehydrogenase in blood plasma at the end of reperfusion. It also improved the metabolic state of the reperfused myocardium and reduced the formation of peroxidation products during reperfusion. Gal reduced more effectively the formation of adducts of hydroxyl radicals in the interstitium of the area at risk (AAR) of the rat heart than carnosine. Carnosine at a dose of 1 mg/kg more effectively increased the activity of catalase and glutathione peroxidase in the AAR by the end of reperfusion compared to Gal. In a model of Cu²⁺-initiated oxidation of human plasma LDL 0.1 mM carnosine demonstrated a significantly more pronounced reduction in the formation of lipid radicals compared to Gal. The results show that Gal can be considered as a promising agent that reduces myocardial injury during reperfusion and oxidative stress.

Key words: galanin; carnosine; rat; cardiac ischemia and reperfusion; myocardial infarction; cardiac energy state; lipid peroxidation; antioxidant enzymes

Funding. This work was financially supported by the Russian Foundation for Basic Research (grant Nos. 18-015-00008 and 18-015-00009), the Russian Science Foundation (grant No. 22-15-00013), and the Ministry of Health of the Russian Federation (reg. study No. 121031700143-1).

Received: 31.05.2022; revised: 02.06.2022; accepted: 03.06.2022.