



УДК 577.112

ДЕЙСТВИЕ СИНТЕТИЧЕСКОГО ПЕПТИДА LKEKK ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ИНФАРКТЕ МИОКАРДА

© 2026 г. Е. В. Наволоцкая^{*,#}, Д. В. Зинченко^{*}, А. А. Колобов^{**},
Ю. А. Золотарев^{***}, А. Н. Мурашев^{*}

^{*} Филиал ФГБУН ГНЦ “Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова” РАН, Россия, 142290 Пущино, просп. Науки, 6

^{**} ГНЦ “Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов”, Россия, 197110 Санкт-Петербург, ул. Пудожская, 7

^{***} ФГБУН ГНЦ “Институт молекулярной генетики” РАН, Россия, 123182 Москва, пл. Акад. Курчатова, 2

Поступила в редакцию 26.06.2025 г.

После доработки 07.07.2025 г.

Принята к публикации 11.07.2025 г.

Исследовано действие синтетического пептида LKEKK на миокард крысы в норме и после экспериментального инфаркта миокарда (ЭИМ), вызванного перевязкой передней нисходящей ветви левой коронарной артерии. Установлено, что [³H]LKEKK с высоким сродством и специфичностью связывается с мембранами миокарда крысы до ЭИМ ($K_i = 1.9$ нМ). Через 1 ч после операции наблюдалось резкое снижение аффинности связывания ($K_d = 13.4$ нМ), через 24 ч она существенно возросла ($K_d = 3.5$ нМ), а через 72 ч почти полностью восстанавливалась ($K_d = 2.1$ нМ). Показано, что терапия ЭИМ препаратом рибоксином (перорально в дозе 10 мг/кг один раз в сутки курсом 7 дней после инфаркта) совместно с пептидом LKEKK (интраназально в дозе 500 мкг на крысу по той же схеме) оказывает выраженное противоишемическое действие: улучшает коронарный кровоток в постинфарктный период, увеличивает сократительную активность миокарда в постинфарктный период, способствует нормализации нарушений атриовентрикулярной проводимости миокарда. Отмечается также достоверное снижение интенсивности цитолиза миокарда и перекисного окисления липидов. Все перечисленные эффекты были выражены сильнее, чем в случае терапии рибоксином без пептида. Таким образом, пептид может быть использован в комплексной терапии ишемической болезни сердца и перенесенного инфаркта миокарда.

Ключевые слова: белки, пептиды, рецепторы, инфаркт миокарда

DOI: 10.7868/S1998286026010062

ВВЕДЕНИЕ

Инфаркт миокарда (ИМ) – одна из важных социально-значимых проблем здравоохранения, обусловленная высокой заболеваемостью и смертностью. В связи с ускорением темпов распространения ИМ решающее значение имеет разработка и применение новых эффективных средств и методов профилактики и лечения этого заболевания [1, 2].

Несколько лет назад мы синтезировали пептид LKEKK, соответствующий последовательностям 16–20 тимозина- α_1 (ТМ- α_1) и 131–135 интерферона- α_2 (IFN- α_2) человека. Исследование активности

пептида показало, что он способен оказывать противомикробное и противовоспалительное действие *in vitro* и *in vivo* [3–7].

Цель настоящей работы – изучение действия пептида LKEKK на миокард крысы в норме и после экспериментального инфаркта миокарда.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Основные характеристики пептидов LKEKK и KKEKL приведены в табл. 1. Реакцией высокотемпературного твердофазного каталитического изотопного обмена был получен меченный тритием

Сокращения: АЛТ – аланинаминотрансфераза; АСТ – аспаргатаминотрансфераза; ИМ – инфаркт миокарда; КФ – кислая фосфатаза; ЛДГ – лактатдегидрогеназа; МДА – малоновый диальдегид; СДГ – сукцинатдегидрогеназа; ЧСС – частота сердечных сокращений; ЭИМ – экспериментальный инфаркт миокарда; ЭКГ – электрокардиограмма.

[#] Автор для связи: (тел.: +7 (496) 773-66-68; эл. почта: navolotskaya@bibch.ru).

Таблица 1. Основные характеристики синтезированных пептидов

Пептид	Чистота, %	Данные аминокислотного анализа	<i>M</i> , Да
LKEKK	>98	Glu 1.09 (1), Leu 1.00 (1), Lys 3.27 (3)	645.2 (расчетное значение – 644.87)
KKEKL	>97	Glu 1.12 (1), Leu 1.03 (1), Lys 3.32 (3)	1.6 (расчетное значение – 644.87)

пептид LKEKK ($[^3\text{H}]$ LKEKK, 2 мКи, удельная активность 42 Ки/моль). Время удерживания $[^3\text{H}]$ LKEKK и немеченого LKEKK на колонке Kromasil C18 (условия хроматографии приведены в разделе “Эксперим. часть”) совпадало; отношения экстинкций при 220 и 280 нм для меченого и немеченого пептида также совпадали, что свидетельствует о сохранении химического строения LKEKK при замещении водорода на тритий.

Исследование связывания $[^3\text{H}]$ LKEKK с мембранами миокарда крысы при 4°C показало, что динамическое равновесие в системе “меченый пептид–рецептор” устанавливалось примерно через 1 ч и сохранялось в течение 2 ч. Поэтому для определения величины равновесной константы диссоциации (K_d) реакцию связывания $[^3\text{H}]$ LKEKK с мембранами проводили в течение 1 ч. Неспецифическое связывание $[^3\text{H}]$ LKEKK в этих условиях составляло $7.1 \pm 1.3\%$ от величины его общего связывания.

На рис. 1 приведен график Скэтчарда (1), характеризующий специфическое связывание $[^3\text{H}]$ LKEKK с мембранами миокарда крысы до ЭИМ. Линейность графика свидетельствует о наличии на мембранах миокарда одного типа рецепторов к пептиду, а величина $K_{d1} = 1.9 \pm 0.2$ нМ – о высоком сродстве пептида к рецептору. Плотность рецепторов – V_{max} – составила 0.3 ± 0.1 пмоль/мг белка.

Графики 2, 3 и 4 на рис. 1 характеризуют связывание $[^3\text{H}]$ LKEKK с мембранами, выделенными из миокарда крыс, соответственно, через 1, 24 и 72 ч после ЭИМ. Видно, что плотность рецепторов практически не менялась, в то время как аффинность связывания резко снижалась через 1 ч после операции ($K_{d2} = 13.4 \pm 0.3$ нМ, график 2). Через 24 ч после ЭИМ сродство $[^3\text{H}]$ LKEKK к рецептору возрастало ($K_{d3} = 3.5 \pm 0.3$ нМ, график 3), а через 72 ч почти полностью восстанавливалось ($K_{d4} = 2.1 \pm 0.3$ нМ, график 4).

Для характеристики специфичности связывания в качестве потенциальных конкурентов $[^3\text{H}]$ LKEKK были протестированы немеченые пептиды LKEKK и KKEKL. Согласно полученным результатам, специфическое связывание $[^3\text{H}]$ LKEKK с мембранами ингибировал пептид LKEKK ($K_i = 2.4 \pm 0.3$ нМ), в то время как пептид с инвертированной последовательностью KKEKL был неактивен ($K_i > 10$ мкМ),

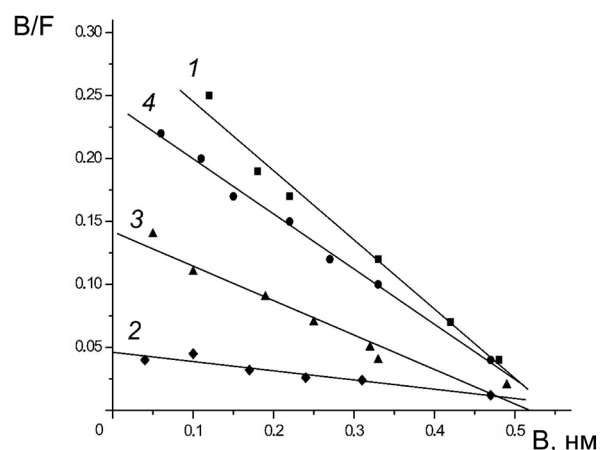


Рис. 1. Анализ в координатах Скэтчарда специфического связывания пептида $[^3\text{H}]$ LKEKK с мембранами миокарда крысы в норме (1) и через 1 (2), 24 (3), и 72 (4) ч после ЭИМ. В и F – молярные концентрации связанного и свободного меченого пептида соответственно.

что подтверждает высокую специфичность связывания меченого пептида.

Многочисленные исследования показывают, что инфаркт миокарда (ИМ) характеризуется формированием очага некроза, недостаточностью коронарного кровотока, угнетением сократительной активности миокарда, нарушением атриовентрикулярной и внутрижелудочковой проводимости, тканевого дыхания и метаболизма, активацией перекисного окисления липидов и снижением антиоксидантной защиты [1, 8–11].

Экспериментальное моделирование инфаркта миокарда сопровождалось ~20–26%-ной смертностью; таким образом, в исследовании наблюдались 11–12 животных из каждой группы. Результаты исследования динамики ЭКГ не выявили практически никаких различий между группами до начала моделирования ИМ (табл. 2). Согласно данным ЭКГ (регистрации подъема сегмента ST, характеризующего наличие инфаркта миокарда), после моделирования ЭИМ не наблюдалось достоверных различий в частоте возникновения ИМ в экспериментальных группах: частота ИМ составляла в среднем 83%.

В табл. 3 приведены данные о влиянии исследуемых препаратов на величину сегмента ST в

Таблица 2. Частота сердечных сокращений (ЧСС) и показатели ЭКГ экспериментальных животных до ЭИМ

Показатель	Экспериментальная группа				
	I	II	III	IV	V
ЧСС, уд/мин	445 ± 30	463 ± 30	452 ± 28	427 ± 31	441 ± 31
P, мВ	0.29 ± 0.06	0.30 ± 0.06	0.26 ± 0.05	0.31 ± 0.06	0.28 ± 0.06
R, мВ	1.71 ± 0.19	1.83 ± 0.17	1.86 ± 0.18	1.71 ± 0.20	1.65 ± 0.19
S, мВ	0.45 ± 0.12	0.44 ± 0.11	0.46 ± 0.12	0.42 ± 0.11	0.47 ± 0.12
T, мВ	0.21 ± 0.05	0.23 ± 0.05	0.22 ± 0.04	0.21 ± 0.05	0.23 ± 0.05
PQ, мс	36 ± 10	33 ± 10	37 ± 9	36 ± 9	33 ± 10
QT, мс	48 ± 5	45 ± 4	46 ± 4	46 ± 5	52 ± 4

Примечание: данные приведены в виде $M \pm m$. Аритмия в экспериментальных группах не зарегистрирована.

Таблица 3. Влияние исследуемых препаратов на величину сегмента ST у крыс с ЭИМ

Время после операции	Величина сегмента ST, мм			
	Группа II	Группа III	Группа IV	Группа V
1 ч	1.42 ± 0.14	1.46 ± 0.16	1.39 ± 0.15	1.48 ± 0.15
3 сут	-0.93 ± 0.11	-0.54 ± 0.12*	-0.64 ± 0.13*	-0.49 ± 0.15*
7 сут	-1.24 ± 0.11	-0.65 ± 0.13*	-0.77 ± 0.16*	-0.23 ± 0.11*

Примечание: данные приведены в виде $M \pm m$.

* $p < 0.05$ по сравнению с группой II.

ЭКГ крыс с ИМ (регистрация подъема сегмента ST – основной диагностический признак инфаркта). Видно, что через 1 ч после моделирования ЭИМ величина подъема сегмента ST достоверно не отличалась между группами.

Снижение сегмента ST ниже изолинии (депрессия) характеризует постинфарктные ишемические изменения и свидетельствует о недостаточности кровоснабжения и гипоксии миокарда. Результаты, приведенные в табл. 3, показывают, что величина депрессии сегмента ST через 3 сут после ЭИМ в группах III (терапия рибоксином) и IV (рибоксин + пептид в дозе 200 мкг на крысу) была в 1.5, а в группе V (рибоксин + пептид в дозе 500 мкг на крысу) – в 2 раза меньше, чем в группе II (ЭИМ без терапии).

Через 7 сут после ЭИМ величина депрессии сегмента ST в ЭКГ животных в группе II достоверно увеличилась в 1.2 раза по сравнению со сроком 3 сут (табл. 3). На фоне терапии у крыс в группах III и IV величина депрессии сегмента ST не изменялась, а в группе V – достоверно снижалась в 2 раза и была в 4 раза менее выражена, чем в контроле (группа II). Полученные результаты свидетельствуют о способности пептида повышать устойчивость миокарда к гипоксии.

В табл. 4 приведены данные о влиянии рибоксина и пептида LKEKK на динамику частоты сердечных сокращений (ЧСС) и показателей ЭКГ у крыс после ЭИМ. Видно, что в группе II (ЭИМ без лечения) наблюдался выраженный стойкий отрицательный хронотропный эффект (достоверное снижение ЧСС на 30–40% через 1 ч и 7 сут по сравне-

нию с группой I). Кроме того, у крыс этой группы наблюдались следующие достоверные изменения ЭКГ через 7 сут: уменьшение в 2 раза амплитуды зубца R по сравнению со сроком наблюдения 1 ч и группой I, что характеризует угнетение сократительной активности миокарда в постинфарктный период; а также удлинение зубцов PQ и QT в 2.4 и 2 раза по сравнению со сроком наблюдения до ЭИМ, свидетельствующее о стойком прогрессирующем нарушении атриовентрикулярной (PQ) и внутрижелудочковой (QT) проводимости.

На фоне терапии рибоксином (группа III) сохранялось достоверное снижение ЧСС, уменьшение амплитуды зубца R и удлинение зубца QT через 7 сут по сравнению с нормой (группа I) и со сроком наблюдения 1 ч. В то же время достоверного удлинения зубца PQ не происходило, что свидетельствует о нормализации атриовентрикулярной проводимости (табл. 4).

Пептид (группы IV и V) также не влиял на ЧСС – брадикардия была на том же уровне, что и в группах II и III (табл. 4). В то же время через 7 сут не происходило достоверного снижения амплитуды зубца R и наблюдалось достоверное (в 2 раза) повышение амплитуды зубца T, что свидетельствует о повышении сократительной активности. Как и в случае терапии рибоксином, в группах IV и V имели место достоверные нарушения внутрижелудочковой проводимости (удлинение QT в 1.3 и 1.5 раза через 1 ч и 7 сут по сравнению со сроком наблюдения до ЭИМ) и нормализация атриовентрикулярной проводимости.

Таблица 4. Влияние исследуемых препаратов на динамику частоты сердечных сокращений (ЧСС) и показателей ЭКГ у крыс с ЭИМ

Время после операции	Показатель						
	ЧСС	P	R	S	T	PQ	QT
Группа II							
1 ч	323 ± 27 [#]	0.022 ± 0.001	2.01 ± 0.43	0.048 ± 0.02	0.26 ± 0.13	30 ± 5	64 ± 9 [#]
7 сут	274 ± 20 ^{*, #}	0.020 ± 0.008	0.80 ± 0.19 ^{*, #}	0.038 ± 0.01	0.22 ± 0.17	80 ± 8 ^{*, #}	90 ± 15 ^{*, #}
Группа III							
1 ч	315 ± 36 [#]	0.022 ± 0.001	2.02 ± 0.45	0.049 ± 0.01	0.27 ± 0.13	39 ± 5	61 ± 9 [#]
7 сут	334 ± 14 [#]	0.017 ± 0.003	0.97 ± 0.20 ^{*, #}	0.046 ± 0.01	0.28 ± 0.10	43 ± 7	70 ± 13 [#]
Группа IV							
1 ч	316 ± 16 [#]	0.022 ± 0.003	2.02 ± 0.42	0.054 ± 0.02	0.26 ± 0.13 [#]	35 ± 7	60 ± 9 [#]
7 сут	277 ± 14 ^{*, #}	0.018 ± 0.002	1.94 ± 0.40	0.043 ± 0.01	0.57 ± 0.21 [#]	28 ± 10	72 ± 7 [#]
Группа V							
1 ч	320 ± 34 [#]	0.022 ± 0.0009	1.93 ± 0.46	0.047 ± 0.009	0.25 ± 0.12 [#]	28 ± 5	63 ± 8 [#]
7 сут	314 ± 21 [#]	0.033 ± 0.002	1.81 ± 0.41	0.039 ± 0.01	0.58 ± 0.20 ^{*, #}	55 ± 1 [*]	70 ± 6 [#]

* $p < 0.05$ по сравнению со сроком наблюдения 1 ч.[#] $p < 0.05$ по сравнению с нормой – до ЭИМ.

Результаты морфометрических и биохимических исследований на фоне ЭИМ представлены в табл. 5. Оказалось, что ЭИМ характеризуется достоверным увеличением относительной массы сердца. Кроме того, наблюдались достоверные признаки цитолиза в миокарде: увеличение активности АЛТ, АСТ, КФ и ЛДГ в плазме крови.

Фиксировались нарушения процессов тканевого дыхания и метаболизма в миокарде: снижались запасы АТФ, гликогена; повышалось содержание недоокисленных продуктов обмена – молочной кислоты; наблюдалась активация свободно-радикальных реакций (увеличение концентрации МДА – конечного продукта перекисного окисления

Таблица 5. Влияние исследуемых препаратов на морфометрические и биохимические показатели экспериментальных животных

Показатель	Экспериментальная группа				
	I	II	III	IV	V
Масса тела, г	184 ± 10	182 ± 10	194 ± 10	205 ± 10	190 ± 5
Относительная масса сердца, мг/100 г массы тела	3.5 ± 0.1	4.9 ± 0.3	3.5 ± 0.1 [*]	3.2 ± 0.1 [*]	3.3 ± 0.2 [*]
АЛТ, кровь, мкЕ/л	0.22 ± 0.03	2.46 ± 0.45	1.19 ± 0.12 [*]	0.88 ± 0.26	0.55 ± 0.22
АСТ, кровь, мкЕ/л	0.65 ± 0.05	2.85 ± 0.12	1.17 ± 0.19 [*]	0.99 ± 0.21 [*]	0.72 ± 0.12 [*]
КФ, кровь, мкЕ/л	0.71 ± 0.10	1.96 ± 0.16	0.95 ± 0.11 [*]	0.90 ± 0.11 [*]	0.73 ± 0.13 [*]
ЛДГ, кровь, ммоль/ч/л	4.90 ± 0.32	8.92 ± 0.36	6.77 ± 0.27	6.80 ± 0.25	4.92 ± 0.33 [*]
Каталаза, кровь, мг·мл/мин	445 ± 20	252 ± 28	263 ± 35	327 ± 43	312 ± 47
МДА сыворотки, нмоль/мг белка	1.65 ± 0.25	4.82 ± 0.33	4.83 ± 0.32	3.11 ± 0.24	3.17 ± 0.20
Восстановленный глутатион, сердце, мг%	85 ± 10	40 ± 5	45 ± 6	57 ± 12	64 ± 13 [*]
Гликоген, сердце, мг%	2450 ± 110	850 ± 90	1350 ± 120 [*]	1990 ± 110 [*]	2160 ± 140 [*]
Молочная кислота, сердце, мг%	60 ± 10	185 ± 15	170 ± 13	93 ± 7 [*]	65 ± 11 [*]
АТФ, сердце, мкмоль/г	2.30 ± 0.11	0.55 ± 0.10	1.23 ± 0.14 [*]	1.51 ± 0.12 [*]	2.23 ± 0.15 [*]
СДГ, сердце, мкг формазана/г белка/ч	145 ± 15	75 ± 10	55 ± 13	80 ± 12	98 ± 10
Интенсивность тканевого дыхания, сердце, мкл O ₂ /100 мг/ч	61 ± 6	38 ± 4	38 ± 5	37 ± 5	52 ± 6
МДА, сердце, нмоль/мг белка	3.57 ± 0.35	7.50 ± 0.45	4.52 ± 0.34 [*]	4.11 ± 0.23 [*]	3.49 ± 0.31 [*]
Каталаза, сердце, мг·мл/мин	475 ± 20	260 ± 35	256 ± 39	315 ± 42	331 ± 46

Примечание: данные приведены в виде $M \pm m$. АЛТ – аланинаминотрансфераза; АСТ – аспаратаминотрансфераза; КФ – кислая фосфатаза; ЛДГ – лактатдегидрогеназа; МДА – малоновый диальдегид, СДГ – сукцинатдегидрогеназа.

* Различия достоверны по сравнению с группой II ($p < 0.05$).

липидов) и снижение уровня антиоксидантной защиты (каталазы, СДГ, ВГ). Совместная терапия рибоксином и пептидом (группы IV и V) достоверно снижала активность АСТ, КФ и ЛДГ крови, нормализовала относительную массу сердца, а также содержание молочной кислоты и МДА, увеличивала содержание гликогена и АТФ в миокарде.

Результаты гистологических исследований представлены на рис. 2 и 3. На рис. 1а приведена типичная гистологическая картина миокарда левого желудочка сердца интактной крысы. Отчетливо видны поперечная исчерченность миофибрилл и ядра кардиомиоцитов. Через 24 ч после операции в миокарде левого желудочка крыс группы II наблюдались общие расстройства кровообращения в виде полнокровия, небольших кровоизлияний, стазов крови в капиллярах, отека. Преимущественно под эпикардом видны мышечные волокна, интенсивно окрашенные эозином или пикриновой кислотой (рис. 2б). Через трое суток (рис. 2в) расстройство кровообращения носило уже не общий, а местный характер. На рис. 2в видно, что кардиомиоциты гомогенно окрашены эозином, т.е. лишены поперечной исчерченности и ядер. Большая часть некротизированных волокон находится в состоянии лизиса и окрашена очень бледно. В зоне некроза видны гемолизированные эритроциты и полиморфноядерные лейкоциты.

Строма миокарда вне зоны некроза была отечной. На 7-е сут (рис. 2г) наблюдалось рассасывание некротизированных волокон и замещение участков некроза молодой соединительной тканью, богатой клеточными элементами преимущественно фибробластического ряда. В более поздние сроки на месте этих очагов пролиферации формировался фиброзный рубец.

У крыс опытных групп (III–V) через 24 ч после ЭИМ общее расстройство кровообращения миокарда левого желудочка сердца было менее выражено по сравнению с группой II. В участке ишемии наблюдалась накопление лейкоцитов в мышечных волокнах (эозинофилия мышечных волокон) и небольшой отек. Через трое суток (рис. 3а–в) наблюдалось формирование инфаркта миокарда, преимущественно под эпикардом передней стенки левого желудочка. Размеры очага некроза были значительно меньше, чем у контрольных крыс. На рис. 3в (группа V) различима поперечная исчерченность миофибрилл. Лейкоцитарная инфильтрация вокруг очага некроза была слабо выражена. Интерстициальный отек вне зоны ишемии отсутствовал.

На 7-е сут на месте некротизированных волокон наблюдалась пролиферативная реакция стромы с большим количеством клеток фибробластического ряда. Размеры участка пролиферации были меньше по сравнению с контролем (группа III).

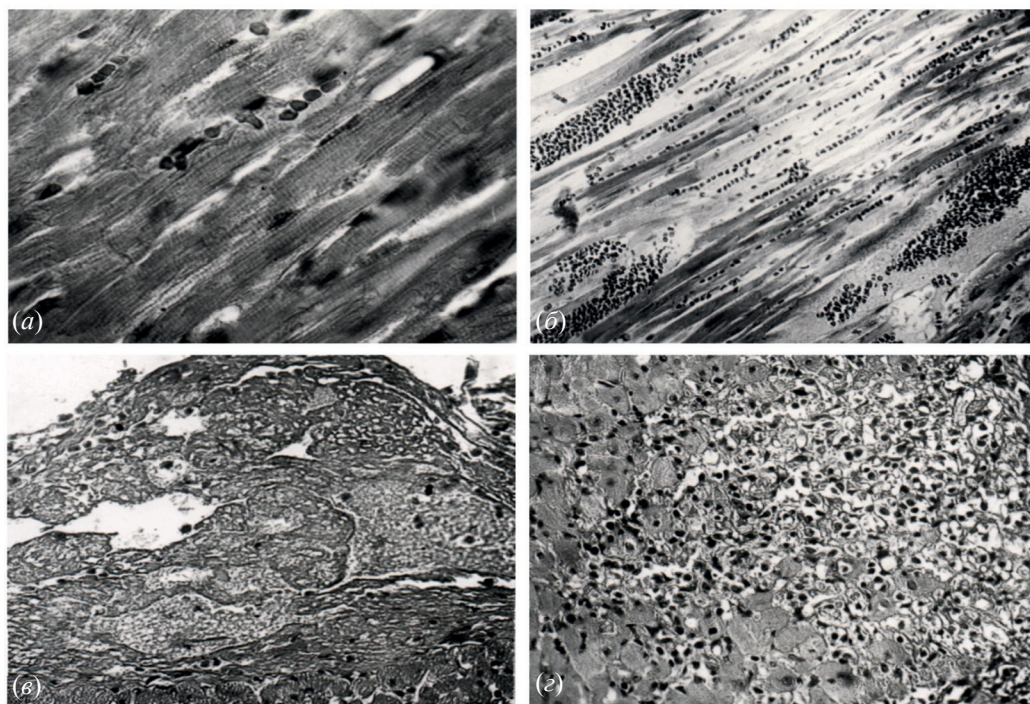


Рис. 2. Гистологическая картина миокарда левого желудочка сердца крысы: интактной (а), группы II через 24 ч (б), через 3 (в) и 7 (г) сут после ЭИМ. Окрашивание по Ван-Гизону, увеличение 40×7 .

На рис. 3г в зоне инфаркта видна молодая соединительная ткань с большим количеством фибробластов (группа V).

Суммируя полученные результаты, можно сделать следующие выводы: пептид LKEKK способен с высоким сродством и высокой специфичностью связываться с мембранами миокарда крысы. Совместная 7-дневная терапия ЭИМ стандартным препаратом рибоксином и пептидом оказывает выраженное противоишемическое действие: улучшает коронарный кровоток, увеличивает сократительную активность миокарда (при дозе пептида 200 мкг на крысу – в 1.5, при дозе 500 мкг на крысу – в 4 раза), способствует нормализации нарушений атриовентрикулярной

проводимости миокарда, причем данный эффект достигается уже при дозе пептида 200 мкл на крысу. Кроме того, отмечается достоверное снижение интенсивности цитолиза миокарда и перекисного окисления липидов, а также повышение уровня антиоксидантной защиты. Все перечисленные эффекты были выражены сильнее, чем в случае терапии рибоксином без пептида.

Таким образом, синтетический пептид LKEKK обладает значительной противоишемической и кардиопротекторной активностью, он имеет простую структуру, не токсичен и не аллергенен – все это делает его потенциально пригодным для использования в профилактике и терапии сердечно-сосудистых заболеваний.

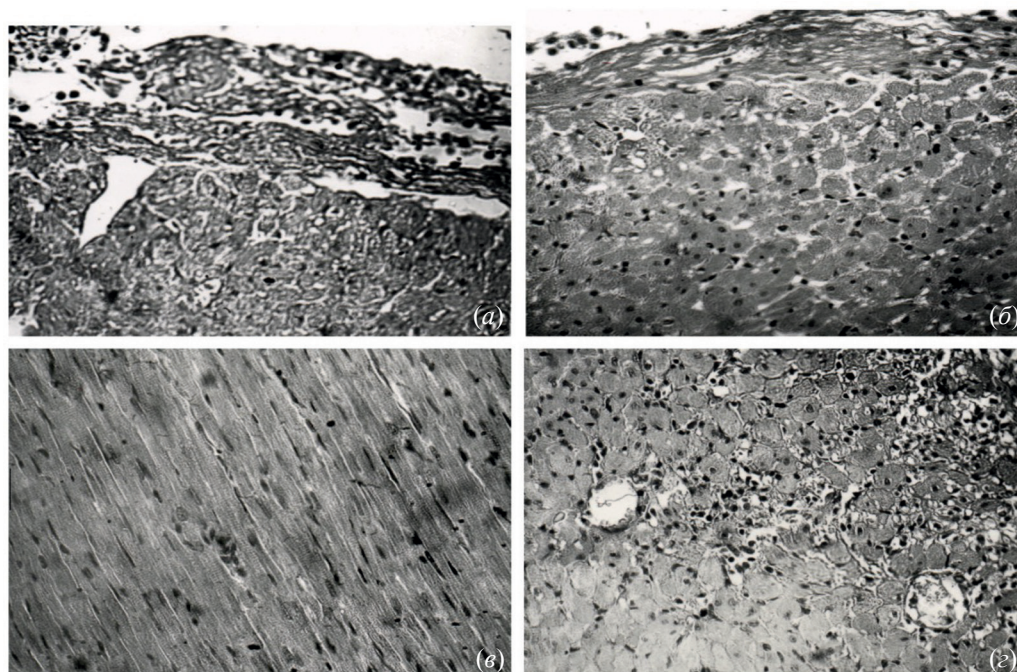


Рис. 3. Гистологическая картина миокарда левого желудочка сердца крысы в группах III (а), IV (б) и V (в) через 3 сут и в группе V (г) через 7 сут после ЭИМ. Окрашивание по Ван-Гизону, увеличение 40×7 .

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Реактивы. В работе использовали фенолметилсульфонилфторид (PMSF), Tris (Fluka, США), фетальную сыворотку теленка, окись алюминия (Al_2O_3) (Sigma, США); L-глутамин, *N*-(2-гидроксиэтил)пиперазин-*N'*-2-этилсульфоновую кислоту (HEPES), Rh/Al_2O_3 (Flow, США); сахарозу, БСА, фенолметилсульфонилфторид (PMSF), азид натрия (NaN_3) (Serva, Германия); *N*-метилпирролидон, диизопропилкарбодиимид, 1-гидроксibenзотриазол, тиоанизол (Merck, Германия); сцинтиллятор

Unisolv 100 (Amersham, Великобритания); рибоксин (9- β -D-рибофуранозилгипоксантин, ООО “Нижфарм”, Россия). Остальные реактивы имели квалификацию “ос. ч.”. Для культивирования клеток использовали среду RPMI-1640 (Serva, ФРГ). Дистиллированную воду дополнительно очищали с помощью системы Mono-Q (Millipore, США).

Пептиды. Пептиды LKEKK и KKEKL синтезировали на автоматических синтезаторах (модель 430A и Vega Coupler, модель C250; Applied Biosystems, США) с использованием Boc/Bzl-тактики

наращивания пептидной цепи и очищали препаративной обращенно-фазовой хроматографией (хроматограф Gilson, Франция), колонка Waters SymmetryPrep C18 (19 × 300 мм) (Malva, Греция). Синтезированные пептиды были охарактеризованы данными аналитической обращенно-фазовой ВЭЖХ (хроматограф Gilson, Франция; колонка XTerra RP18, Malva, Греция), аминокислотного анализа (гидролиз 6 М HCl, 24 ч, 110°C; аминокислотный анализатор 4151 Alpha Plus, LKB, Швеция) и масс-спектрального анализа (масс-спектрометр Finnigan, США).

Получение [³H]LKEKK. Для получения [³H]LKEKK использовали реакцию высокотемпературного твердофазного каталитического изотопного обмена (ВТКИО) [12]. К раствору пептида (1.0 мг в 1 мл воды) добавляли 20 мг окиси алюминия и упаривали на ротаторном испарителе при 20°C. Окись алюминия с нанесенным пептидом смешивали с 10 мг катализатора (5% Rh/Al₂O₃). Полученную твердую смесь помещали в ампулу объемом 10 мл. Ампулу вакуумировали, заполняли газобразным тритием до давления 250 мм рт. ст., нагревали до 170°C и выдерживали при этой температуре в течение 20 мин. Затем ампулу охлаждали, вакуумировали, продували водородом и повторно вакуумировали. Меченый пептид экстрагировали из твердой реакционной смеси двумя порциями по 3 мл 50%-ного водного этанола, полученный раствор объединяли и упаривали. Для удаления лабильного трития процедуру повторяли дважды. Очистку меченого пептида проводили методом ВЭЖХ со спектрофотометром Beckman (США) при длинах волн 220 и 280 нм последовательно на колонках Kromasil C18 (10 × 250 мм) и MN C8 (8 × 250 мм) при 20°C в градиенте концентрации водного раствора ацетонитрила в присутствии 0.1%-ной трифторуксусной кислоты. Включение трития в пептид рассчитывали с использованием жидкостного сцинтилляционного счета.

Животные. Крыс-самцов линии SD весом 180–200 г получали из питомника ФИБХ РАН. Клетки с животными помещали в отдельные комнаты со световым режимом 12 ч – свет, 12 ч – темнота, температурой воздуха в пределах 19–25°C и относительной влажностью 50–70%. Температуру и влажность воздуха регистрировали ежедневно. Был установлен режим проветривания, обеспечивающий ~15 объемов помещения в час, концентрацию CO₂ не более 0.15 об. %, аммиака – не более 0.001 мг/л. В течение исследования каждое животное осматривали ежедневно. Осмотр проводили через 1 ч после введения препаратов, он

включал оценку поведения и общего состояния животных.

Связывание [³H]LKEKK с мембранами миокарда. Мембраны из миокарда крыс выделяли согласно методике [13], концентрацию белка определяли по Лоури [14], используя в качестве стандарта бычий сывороточный альбумин.

Реакцию связывания [³H]LKEKK с мембранами проводили в 50 mM Tris-HCl-буферном растворе, содержащем PMSF (0.6 мг/мл), pH 7.5, по следующей схеме: в стеклянные силиконизированные пробирки вносили 100 мкл меченого пептида из раствора с концентрацией 10⁻¹⁰–10⁻⁷ М (три параллельные пробы для каждой концентрации), 100 мкл буфера (общее связывание) или 100 мкл 10⁻³ М раствора немеченого пептида в буфере (неспецифическое связывание) и 800 мкл суспензии свежelyделенных мембран (2 мг белка). Пробирки инкубировали при 4°C в течение 1 ч, реакционную смесь фильтровали через стекловолоконные фильтры GF/B (Whatman, Англия). Фильтры трижды промывали 5 мл ледяного буферного раствора. Радиоактивность на фильтрах подсчитывали с помощью жидкостного сцинтилляционного счетчика LS 5801 (Beckman, США). Величину специфического связывания [³H]LKEKK с мембранами определяли по разности между его общим и неспецифическим связыванием. Для определения параметров специфического связывания [³H]LKEKK с мембранами (равновесной константы диссоциации K_d и плотности рецепторов B_{max} – максимальной связывающей способности в расчете на 1 мг белка) строили график зависимости отношения молярных концентраций связанного (B) и свободного (F) меченого пептида от молярной концентрации связанного меченого пептида (B) (график Скэтчарда) [15].

Для оценки специфичности связывания тестировали способность немеченых пептидов LKEKK и KKEKL ингибировать специфическое связывание [³H]LKEKK с мембранами миокарда: суспензию мембран (1.5 мг белка, 800 мкл) инкубировали с [³H]LKEKK (5 нМ, 100 мкл) и одним из потенциальных ингибиторов (диапазон концентраций 10⁻¹⁰–10⁻⁴ М, три повтора для каждой концентрации) в 50 mM Tris-HCl-буферном растворе, содержащем PMSF (0.6 мг/мл), pH 7.5, при 4°C в течение 1 ч. Затем реакционную смесь фильтровали через стекловолоконные фильтры GF/B (Whatman, Англия). Фильтры трижды промывали 5 мл ледяного буферного раствора. Радиоактивность на фильтрах подсчитывали с помощью жидкостного сцинтилляционного счетчика LS 5801

(Beckman, США). Константу ингибирования (K_i) определяли по формуле:

$$K_i = IC_{50}/(1 + L/K_d),$$

где L – молярная концентрация [3H]LKEKK; K_d – равновесная константа диссоциации комплекса [3H]LKEKK–рецептор; IC_{50} – концентрация немеченого лиганда, вызывающая 50%-ное ингибирование специфического связывания меченого [3H]LKEKK [16]. Величину IC_{50} определяли графически на основании кривой ингибирования (график зависимости ингибирования (%) от молярной концентрации ингибитора).

Экспериментальный инфаркт миокарда (ЭИМ). Моделирование инфаркта миокарда у крыс проводили перевязкой передней нисходящей ветви левой коронарной артерии. Под эфирным наркозом рассекали кожу и подкожную жировую клетчатку животного, грудные и межреберные мышцы раздвигали вдоль хода волокон. После вскрытия грудной клетки сердце выводили в операционную рану, левую коронарную артерию прошивали и перевязывали лигатурой. Контроль наступления ишемии миокарда проводили электрокардиографически. После операции рану послойно ушивали.

Регистрация ЭКГ. Регистрацию ЭКГ осуществляли на ненаркотизированных крысах с помощью полиграфа RM-6000 (Япония). Животных помещали в специальные пластмассовые клеточки-пеналы. В качестве электродов использовали тонкие стальные иглы, введенные подкожно. ЭКГ записывали в отведении I. Электрокардиографическим признаком ИМ у крыс считали регистрацию подъема сегмента ST через 1 ч после операции.

Вес тела крыс определяли на весах ВЛР-500 (СмартВес, Россия). Сердца животных взвешивали на электронных весах 1602 MP (Sartorius, ФРГ).

Исследуемые препараты. Препарат рибоксин, широко применяемый в комплексной терапии ишемической болезни сердца и перенесенного инфаркта миокарда [17–19], вводили перорально в дозе 10 мг/кг один раз в сутки курсом 7 дней после ЭИМ. Пептид LKEKK в дозах 200 и 500 мкг на крысу в 100 мкл дистиллированной воды вводили интраназально одновременно с рибоксином по той же схеме. Животные контрольных групп получали растворитель – дистиллированную воду. Сравнительную эффективность препаратов оценивали по нескольким показателям: летальности и клинической картине; функциональным – ЭКГ (1 ч, 3 дня и 7 дней), биохимическим (исследование

крови и ткани сердца через 24 ч после ЭИМ), гистологическим (24 ч, 3 дня и 7 дней).

Экспериментальные группы. Было сформировано пять экспериментальных групп по 15 животных в каждой: группа I – ложнооперированные животные (отрицательный контроль); группа II – животные с ЭИМ без лечения (положительный контроль); группа III – животные с ЭИМ, терапия препаратом рибоксином (10 мг/кг перорально); группа IV – животные с ЭИМ, терапия препаратом рибоксином 10 мг/кг перорально + LKEKK 200 мкг на крысу интраназально; группа V – животные с ЭИМ, терапия препаратом рибоксином 10 мг/кг перорально + LKEKK 500 мкг на крысу интраназально.

Биохимические и гистологические исследования. Кровь для биохимических исследований получали пункцией хвостовой вены. После декапитации проводили патологоанатомическое вскрытие и гистологическое исследование ткани сердца животных. Ткань фиксировали в 10–15%-ном формалине и заливали в парафин. Парафиновые срезы окрашивали гематоксилин-эозином и по Ван-Гизону.

Содержание восстановленного глутатиона в печени определяли йодометрически [20], содержание гликогена в печени – методом Самодьи [21], уровень глюкозы в крови и гомогенатах органов измеряли ортотолуидиновым методом [22]. Активность АЛТ, АСТ, ЩФ, КФ, ЛДГ сыворотки крови определяли с помощью наборов Био-Лат-Тест (Чехия).

Интенсивность тканевого дыхания в гомогенатах органов измеряли манометрическим методом Варбурга [23]. Содержание молочной кислоты в крови определяли по методу Баркера [24], активность сукцинатдегидрогеназы – по методу Вогельса [25].

Статистическую обработку результатов проводили с помощью t -критерия Стьюдента.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Синтезирован пептид LKEKK, обладающий противоишемической и кардиопротекторной активностью. Высокая активность, простая структура, отсутствие токсичности и аллергенности делают его потенциально пригодным для использования в профилактике и терапии сердечно-сосудистых заболеваний.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа не имеет финансовой поддержки.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит результатов исследований с участием людей в качестве объектов.

Информированное согласие не требовалось.

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены. Исследование было одобрено Этическим комитетом ФИБХ (протокол № 4 от 20.06.2025).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ВКЛАД АВТОРОВ

ЕВН – эксперименты на животных, биохимические и гистологические исследования, написание статьи; ДВЗ – рецепторные исследования, построение графиков, подготовка иллюстраций; ААК – синтез пептидов; ЮАЗ – получение меченого пептида LKEKK; АНМ – координация исследований, анализ полученных результатов, работа над статьей.

Все авторы дали одобрение на окончательный вариант рукописи.

ДОСТУПНОСТЬ ДАННЫХ

Данные, подтверждающие выводы настоящего исследования, можно получить у корреспондирующего автора по обоснованному запросу.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Salari N., Morddarvanjoghi F., Abdolmaleki A., Rasoulpoor S., Khaleghi A.A., Hezarkhani L.A., Shohaimi S., Mohammadi M. // BMC Cardiovas. Disord. 2023. V. 23. P. 206.
<https://doi.org/10.1186/s12872-023-03231-w>
2. Иванова М.А., Енина Е.Н., Ваньков Д.В. // Социальные аспекты здоровья населения. 2024. Т. 70. С. 17.
<https://doi.org/10.21045/2071-5021-2024-70-2-17>
3. Navolotskaya E.V., Sadovnikov V.B., Zinchenko D.V., Vladimirov V.I., Zolotarev Y.A., Lipkin V.M., Murashev A.N. // Russ. J. Bioorg. Chem. 2019. V. 45. P. 122–128.
<https://doi.org/10.1134/S1068162019020092>
4. Navolotskaya E.V., Sadovnikov V.B., Zinchenko D.V., Zav'yalov V.P., Murashev A.N. // J. Clin. Exp. Immunol. 2021. V. 6. P. 356–361.
<https://doi.org/10.33140/JCEI.06.05.02>
5. Navolotskaya E.V., Zinchenko D.V., Murashev A.N. // Russ. J. Bioorg. Chem. 2023. V. 49. P. 35–40.
<https://doi.org/10.1134/S106816202301020X>
6. Navolotskaya E.V., Sadovnikov V.B., Zinchenko D.V., Murashev A.N. // J. Clin. Exp. Immunol. 2023. V. 8. P. 590–595.
<https://doi.org/10.33140/JCEI.08.03.01>
7. Navolotskaya E.V., Zinchenko D.V., Kolobov A.A., Zolotarev Yu.A., Murashev A.N. // Rus. J. Bioorg. Chem. 2025. V. 51. P. 793–801.
<https://doi.org/10.1134/S1068162024605950>
8. Borst O., Ochmann C., Schönberger T., Jacoby C., Stellos K., Seizer P., Flögel U., Lang F., Gawaz M. // Cell. Physiol. Biochem. 2011. V. 28. P. 1–12.
<https://doi.org/10.1159/000331708>
9. Lu L., Liu M., Sun R., Zheng Y., Zhang P. // Cell. Biochem. Biophys. 2015. V. 72. P. 865–867.
<https://doi.org/10.1007/s12013-015-0553-4>
10. Reed G.W., Rossi J.E., Cannon C.P. // Lancet. 2017. V. 389. P. 197–210.
[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)30677-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)30677-8)
11. Frampton J., Ortengren A.R., Zeitler E.P. // Yale J. Biol. Med. 2023. V. 96. P. 83–94.
<https://doi.org/10.59249/LSWK8578>
12. Zolotarev Yu.A., Dadayan A.K., Bocharov E.V., Borisov Yu.A., Vaskovsky B.V., Dorokhova E.M., Myasov N.F. // Amino Acids. 1993. V. 24. P. 325–333.
<https://doi.org/10.1007/s00726-002-0404-7>
13. Dal Farra C., Zsurger N., Vincent J.-P., Cupo A. // Peptides. 2000. V. 21. P. 577–587.
[https://doi.org/10.1016/S0196-9781\(00\)00182-0](https://doi.org/10.1016/S0196-9781(00)00182-0)
14. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr O.L., Randal R.J. // J. Biol. Chem. 1951. V. 193. P. 265–275.
15. Pennock B.E. // Anal. Biochem. 1973. V. 56. P. 306–309.
[https://doi.org/10.1016/0003-2697\(73\)90195-4](https://doi.org/10.1016/0003-2697(73)90195-4)
16. Cheng Y.C., Prusoff W. // Biochem. Pharmacol. 1973. V. 22. P. 3099–3108.
[https://doi.org/10.1016/0006-2952\(73\)90196-2](https://doi.org/10.1016/0006-2952(73)90196-2)
17. Wu X., Wang L., Wang K., Li J., Chen R., Wu X., Ni G., Liu C., Das S., Shuijter J.P.G., Li X., Xiao J. // Mol. Ther. 2022. V. 30. P. 400–414.
<https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2021.07.004>
18. Benak D., Kolar F., Hlavackova M. // Physiol. Res. 2024. V. 73 (Suppl 1). P. S185–S198.
<https://doi.org/10.33549/physiolres.935265>
19. Romodin L.A., Nikitenko O.V., Bychkova T.M., Zrilova Y.A., Rodionova E.D., Bocharov D.A. // Bull. Exp. Biol. Med. 2024. V. 176. P. 572–575.
<https://doi.org/10.1007/s10517-024-06069-0>
20. Ellouk-Achard S., Levresse V., Martin C., Pham-Huy C., Dutertre-Catella H., Thevenin M., War-net J.M., Claude J.R. // Arch. Toxicol. Suppl. 1995. V. 17. P. 209–214.
https://doi.org/10.1007/978-3-642-79451-3_18
21. Туц Н.У. // Клиническая оценка лабораторных тестов. М.: Медицина, 1986.
22. Меньшиков В.В. // Лабораторные методы исследования в клинике. М.: Медицина, 1987.
23. Warburg O. // Hoppe Seylers Z. Physiol. Chem. 1967. V. 348. P. 1677–1682.
24. Pryce J.D. // Analyst. 1969. V. 94. P. 151–152.
<https://doi.org/10.1039/an9699401151>
25. Van Noorden C.J., Vögels I.M. // Histochem. J. 1989. V. 21. P. 575–583.
<https://doi.org/10.1007/BF01753358>

Effect of Synthetic Peptide LKEKK in Experimental Myocardial Infarction

E. V. Navolotskaya^{*, #}, D. V. Zinchenko^{*}, A. A. Kolobov^{**},
Yu. A. Zolotarev^{***}, and A. N. Murashev^{*}

[#] Phone: +7 (496) 773-66-68; e-mail: navolotskaya@bibch.ru

^{*} Branch of Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry,
prosp. Nauki 6, Pushchino, 142290 Russia

^{**} State Research Center for Institute of Highly Pure Biopreparations, FMBA of the Russian Federation,
ul. Pudozhskaya 7, St. Petersburg 197110 Russia

^{***} Institute of Molecular Genetics, Russian Academy of Science,
pl. Akad. Kurchatova 2, Moscow, 123182 Russia

The effect of the synthetic peptide LKEKK on the rat myocardium was studied in the norm and after experimental myocardial infarction (EMI) caused by ligation of the left coronary artery. It was found that [³H]LKEKK binds with high affinity and specificity to the membranes of the rat myocardium before EMI ($K_i = 1.9$ nM). One hour after the operation, a sharp decrease in binding affinity was observed ($K_d = 13.4$ nM), after 24 h it increased significantly ($K_d = 3.5$ nM), and after 72 h it was almost completely restored ($K_d = 2.1$ nM). It was established that therapy of EMI with Riboxin (orally at a dose of 10 mg/kg once a day for 7 days after infarction) together with the peptide LKEKK (intranasally at a dose of 500 mkg/rat according to the same scheme) has a pronounced anti-ischemic effect: improves coronary blood flow in the post-infarction period; increases myocardial contractility in the post-infarction period, promotes normalization of atrioventricular conduction disorders of the myocardium. A reliable decrease in the intensity of myocardial cytolysis and lipid peroxidation is also noted. All of the listed effects were more pronounced than in the case of Riboxin therapy without the peptide. Thus, the peptide can be used in complex therapy of ischemic heart disease and myocardial infarction.

Keywords: proteins, peptides, receptors, myocardial infarction